

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
PROF. DR. RALPH WITZGALL
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III –
BIOLOGIE UND VORKLINIKUM
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**HERSTELLUNG MONOKLONALER
ANTIKÖRPER GEGEN DAS
MENSCHLICHE POLYCYSTIN-2 PROTEIN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und Vorklinikum
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kerstin Renner, geb. Vogt aus Regensburg

2010

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
PROF. DR. RALPH WITZGALL
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III –
BIOLOGIE UND VORKLINIKUM
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**HERSTELLUNG MONOKLONALER
ANTIKÖRPER GEGEN DAS
MENSCHLICHE POLYCYSTIN-2 PROTEIN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und Vorklinikum
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kerstin Renner, geb. Vogt aus Regensburg

2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Witzgall
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Mack
Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Überblick über die polyzystischen Nierenerkrankungen	1
1.2	Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD)	1
1.2.1	Klinik	1
1.2.2	Pathologie	1
1.2.3	Genetik	2
1.2.4	Das Genprodukt von <i>PKHD1</i> : Fibrocystin/Polyductin	2
1.3	Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)	3
1.3.1	Klinik	3
1.3.2	Genetik	4
1.3.3	Das Genprodukt von <i>PKD1</i> : Polycystin-1 (PC1)	5
1.3.4	Das Genprodukt von <i>PKD2</i> : Polycystin-2 (PC2)	7
1.3.5	Die Funktion von Polycystin-1 und Polycystin-2	8
1.3.6	Zystenbildung bei ADPKD	8
1.3.7	Diagnostik bei ADPKD	10
1.3.8	Therapie bei ADPKD	11
1.4	Herstellung monoklonaler Antikörper früher und heute	14
1.4.1	Geschichte der monoklonalen Antikörperherstellung	14
1.4.2	Monoklonale Antikörperherstellung heute	16
1.5	Antikörper gegen Polycystin-2	19
1.5.1	anti N-terM	19
1.5.2	anti-PC2 (96525)	19
1.5.3	anti-Zebrafisch Polycystin-2	19
1.5.4	Mu 12	19
1.5.5	Mu 50	20
1.5.6	p30	20
1.5.7	PKD2-CP	20
1.5.8	PKD2-CFP	20
1.5.9	PKD2-NP	21
1.5.10	YCC2	21
1.5.11	YCB9	21
1.5.12	1A11	21
1.5.13	Zusammenfassung der Antikörper	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien, Medien, Reagenzien	23
2.1.2	Kits	25
2.1.3	Verbrauchsmaterial	25
2.1.4	Geräte und Instrumente	27

2.1.5 Software	28
2.1.6 Enzyme.....	29
2.1.7 Plasmide	29
2.1.8 Primärantikörper.....	30
2.1.9 Sekundärantikörper	31
2.1.10 Bakterienstämme	31
2.1.11 Säugerzelllinien.....	32
2.1.12 Medien, Lösungen, Puffer	32
 2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Plasmid-DNA-Midipräparation.....	35
2.2.2 Bestimmung der Konzentration von DNA.....	36
2.2.3 Restriktionsverdau von DNA	36
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	36
2.2.5 Induktion der Proteinsynthese in Bakterien	37
2.2.6 Aufreinigung von Protein mittels Ni ²⁺ -Säule.....	37
2.2.7 Aufreinigung von Protein mittels Glutathion-Säule.....	37
2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
2.2.9 Dialyse von aufgereinigten Proteinen	38
2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.2.11 Coomassie Brilliant Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	39
2.2.12 Tiere und Tierhaltung.....	39
2.2.13 Immunisierung der Mäuse.....	39
2.2.14 Blutentnahme und Serumgewinnung bei Mäusen.....	39
2.2.15 Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen	39
2.2.16 Zählen von Zellen.....	41
2.2.17 Präparation von Peritoneal-Makrophagen.....	41
2.2.18 Durchführung einer Zellfusion.....	41
2.2.19 Durchführung einer Subklonierung.....	42
2.2.20 Gewinnung des „gebrauchten“ HT-Mediums für den Subklonierungsversuch.	43
2.2.21 Transfektion von COS-7-Zellen mittels DEAE-Dextran-Technik.....	43
2.2.22 Herstellung von Zelllysaten	44
2.2.23 Gewinnung von Klonüberständen	44
2.2.24 Durchführung eines direkten ELISA.....	44
2.2.25 Immunfluoreszenz	45
2.2.26 Immunpräzipitation	46
2.2.27 Western Blot.....	46
 3 Ergebnisse	49
3.1 Vorbereitung.....	49
3.1.1 Gewinnung und Darstellung der Proteine	49
3.1.2 pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973).....	52
3.2 Immunisierung der Mäuse.....	52
3.3 Erfolgskontrolle der Immunisierung	53
3.4 Fusion und Testung mittels ELISA	57

3.5	Zweiter ELISA zum Testen der Fusionen.....	58
3.6	Western Blot zur Bestätigung der Testung	60
3.7	Testungen der Klone	61
3.7.1	Testung mittels Western Blot.....	61
3.7.2	Testung mittels Immunpräzipitation	62
3.7.3	Testung mittels Immunfluoreszenz	63
3.8	Versuche des Mediumwechsels	64
3.9	Subklonierung	65
3.10	Erste Subklonierung.....	65
3.10.1	Erster Versuch	65
3.10.2	Zweiter Versuch	67
3.10.3	Dritter Versuch.....	67
3.10.4	Vierter Versuch	68
3.10.5	Fünfter Versuch.....	68
3.11	Zweite Subklonierung	69
3.12	Mediumwechsel	71
3.13	Endergebnisse.....	72
3.14	Klon F1-47 mit den Subklonen F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3.....	72
3.14.1	ELISA.....	72
3.14.2	Immunfluoreszenz.....	72
3.14.3	Immunpräzipitation	73
3.14.4	Western Blot.....	74
3.15	Klon F2-9 mit den Subklonen F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4	75
3.15.1	ELISA.....	75
3.15.2	Immunfluoreszenz.....	76
3.15.3	Immunpräzipitation	76
3.15.4	Western Blot.....	77
4	Diskussion	79
4.1	Vorbemerkungen.....	79
4.2	Grundlagen für die Antikörperherstellung und Testung	79
4.2.1	Proteine.....	79
4.2.2	DNA und Zelltransfektion.....	80
4.3	Immunisierung der Mäuse und Zellfusion	80
4.4	Testung auf gegen Polycystin-2 gerichtete Antikörper.....	81

4.5	Subklonierung	83
4.6	Mediumwechsel	85
4.7	Endergebnisse.....	86
5	Zusammenfassung.....	87
6	Literaturverzeichnis.....	88
7	Abbildungsverzeichnis.....	99
8	Tabellenverzeichnis.....	101
9	Lebenslauf.....	103
10	Eidesstattliche Erklärung.....	105
11	Danksagung.....	106

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
aa	Aminosäuren („amino acids“)
Abb.	Abbildung
ACE	angiotensin converting enzyme
ADPKD	autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung („ <u>autosomal dominant polycystic kidney disease</u> “)
ADPKD1	autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung Typ 1 („ <u>autosomal dominant polycystic kidney disease type 1</u> “)
ADPKD2	autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung Typ 2 („ <u>autosomal dominant polycystic kidney disease type 2</u> “)
ARPKD	autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung („ <u>autosomal recessive polycystic kidney disease</u> “)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AT1	Angiotensin-2-Rezeptor, Typ 1
AC-VI	Adenylylzyklase 6
AQP2	Aquaporin-2
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin („ <u>bovine serum albumin</u> “)
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISP	Consortium for Radiologic Studies of Polycystic Kidney Disease
C-terminal	COOH-terminal
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzymgebundener Immunabsorptionstest („ <u>enzyme-linked immunosorbent assay</u> “)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum („ <u>fetal calf serum</u> “)
FPC	Fibrocystin
g	Erdbeschleunigung
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Gly	Glycin
GPS	G protein-coupled receptor proteolytic site

GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
H	schwere Kette (“heavy chain”)
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HGPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
HT	Hypoxanthin, Thymidin
IC	Immunzytochemie
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPT	Immunglobulin-like-Plexin-Transkriptionsfaktoren
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
L	leichte Kette („light chain“)
M	molar
mA	Milli-Ampere
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
mg	Milligramm
min	Minute
mmol	millimolar
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
mTOR	mammalian target of rapamycin
µg	Mikrogramm (=10 ⁻⁶ g)
µl	Mikroliter (=10 ⁻⁶ l)
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm (=10 ⁻⁹ g)
Ni ²⁺	Nickel-Ion
nm	Nanometer
N-terminal	NH ₂ -terminal
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PACS-1 Protein	phosphofuran acidic cluster sorting protein-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PEG	Polyethylenglykol
PC1	Polycystin-1
PC2	Polycystin-2
PC1L2	Polycystin-1 ähnliches Protein 2 („polycystin-1 like protein 2“)
PC1L3	Polycystin-1 ähnliches Protein 3 („polycystin-1 like protein 3“)
PCL	Polycystin-2 ähnliches Protein („polycystin-2 like protein“)
PC2L2	Polycystin-2 ähnliches Protein 2 („polycystin-2 like protein 2“)
PCREJ	Polycystin-2 like protein with receptor for egg jelly
PKD	Polyzystische Nierenerkrankung („polycystic kidney disease“)

<i>PKD1</i>	Polyzystische Nierenerkrankung Gen 1 („polycystic kidney disease gene 1“)
<i>PKD2</i>	Polyzystische Nierenerkrankung Gen 2 („polycystic kidney disease gene 2“)
<i>PKD3</i>	Polyzystische Nierenerkrankung Gen 3 („polycystic kidney disease gene 3“)
<i>PKHD1</i>	polyzystische Nieren- und Lebererkrankung Gen 1 („polycystic kidney and hepatic disease gene 1“)
<i>PKHD2</i>	polyzystische Nieren- und Lebererkrankung Gen 2 („polycystic kidney and hepatic disease gene 2“)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SRBC	Schafserthrozyten („sheep red blood cells“)
sog.	so genannt
SST2	Somatostatin-2-Rezeptor
STAT6	Signal transducer and activator of transcription protein 6
suREJ	sea urchin receptor for egg jelly
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	transient receptor potential
TRPP	transient receptor potential polycystic
<i>TSC2</i>	tuberous sclerosis gene 2
U	Unit (internationale Einheit)
u. a.	unter anderem
V	Volt
V2	Vasopressin-2-Rezeptor
VEGF	vascular endothelial growth factor
v:v	Verhältnis Volumen zu Volumen
WB	Western Blot

1 Einleitung

1.1 Überblick über die polyzystischen Nierenerkrankungen

Unter angeborener polyzystischer Nierenerkrankung (im anglo-amerikanischen Fachjargon als **Polycystic Kidney Disease, PKD**, bezeichnet) versteht man eine Gruppe von Erkrankungen, die durch das Auftreten flüssigkeitsgefüllter Zysten in der Kindheit oder im Erwachsenenalter gekennzeichnet sind. Man unterscheidet eine autosomal-dominant (ADPKD) von einer autosomal-rezessiv (ARPKD) vererbten Form. Dem gegenüber stehen die beschriebenen erworbenen Formen, auf die im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht näher eingegangen werden soll [Wang 2007].

1.2 Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD)

1.2.1 Klinik

Die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung, mit einer Inzidenz von 1:20.000-40.000 aller Lebendgeburten, hat eine relativ schlechte Prognose [Zerres 1998]. Häufig werden die Kinder bereits im Mutterleib durch vergrößerte, echoarme Nieren sowie durch ein durch die verminderte Harnausscheidung entstandenes Oligohydramnion auffällig [Menezes 2006]. Zusätzlich dazu weisen die betroffenen Patienten meist eine pulmonale Hypoplasie, hyperplastische Gallengänge sowie eine kongenitale Leberfibrose auf [Roy 1997, Zerres 1998]. Die schwersten Fälle, die mit dem Potter'schen Phänotyp assoziiert sind, zeigen darüber hinaus charakteristische Gesichtsveränderungen, Veränderungen der Extremitäten sowie spinale Abnormalitäten [Harris 2008].

In der neonatalen Periode versterben 30-50% der betroffenen Patienten an sekundärem Lungenversagen [Bergmann 2004, Zerres 1996]. Wird jedoch dieser erste Lebensmonat überlebt, liegt die Wahrscheinlichkeit, dass die erkrankten Kinder ein Alter von 15 Jahren erreichen, zwischen 50 und 80% [Roy 1997, Gagnadoux 1998]. Die Überlebenden leiden zumeist an Hypertonie und chronischem Nierenversagen bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz. Im Alter von 15 Jahren bedürfen bis zu 60% der Kinder einer antihypertensiven Therapie [Roy 1997]. Bis zu einem Drittel der Kinder werden im Verlauf Nieren transplantiert [Guay-Woodford 2003].

Allerdings gibt es auch weniger schwere Verläufe, die in der Kindheit, Jugend oder gar erst im Erwachsenenalter diagnostiziert werden. Hier stehen nicht die renalen, sondern die hepatischen Veränderungen mit den daraus resultierenden Komplikationen wie portale Hypertonie, Ösophagusvarizen und deren Blutung sowie eine Cholangitis im Vordergrund [Adeva 2006].

1.2.2 Pathologie

Die ARPKD ist durch eine beidseitige Nierenvergrößerung sowie multiple 1-2 mm große Zysten auf der Nierenoberfläche charakterisiert. Die Nieren können bis zum zehnfachen der physiologischen Norm vergrößert sein und weisen fusiforme und erweiterte Tubuli auf.

Davon sind vor allem die Sammelrohre betroffen, von denen häufig Zysten ausgehen, die von einer Einzelzellschicht bestehend aus kuboidalen Zellen ausgekleidet sind [Osathanondh 1964].

In der Leber zeigen sich oftmals kleine, verformte Gallengänge, die in der Peripherie von zystisch veränderten Portalfeldern angeordnet sind. Sind auch die größeren Gallengänge betroffen, werden die Veränderungen unter dem Begriff Caroli-Erkrankung zusammengefasst. Rezidivierende Cholangitiden führen im Laufe der Erkrankung zu einer zunehmenden Leberfibrose [Desmet 1992].

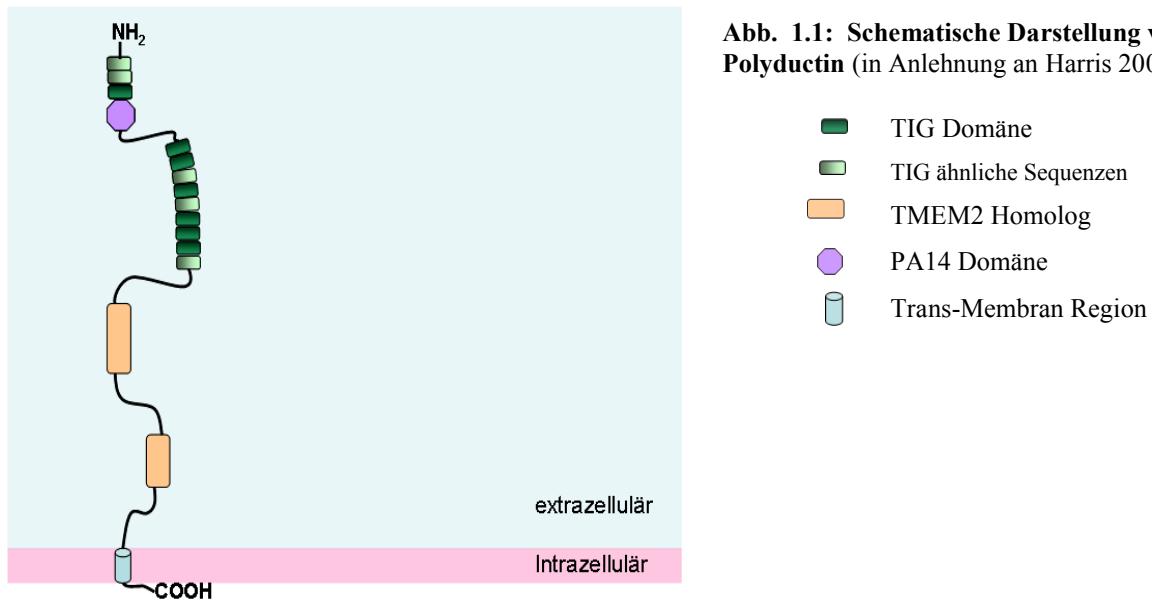
1.2.3 Genetik

ARPKD wird durch eine Mutation in einem einzigen Gen (*PKHD1*- polycystic kidney and hepatic disease gene 1) verursacht, das auf dem Chromosom 6 in der Region 6p21.1-p12 lokalisiert ist [Zerres 1994]. Mit einem Minimum von 86 Exons gehört das *PKHD1* Gen zu den größten menschlichen Genen und umfasst eine genetische Region von über 469 kb. Der größte offene Leserahmen (ORF) umfasst 12.222 bp. *PKHD1* soll am stärksten in der menschlichen fetalen oder adulten Niere exprimiert werden, gefolgt von einer etwas niedrigeren Expression im Pankreas sowie von der niedrigsten Expression in der fetalen oder adulten Leber [Onuchic 2002]. In der erwachsenen Niere soll *PKHD1* vor allem im Bereich der proximalen Tubuli, im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife sowie in den Sammelrohren exprimiert werden [Zhang 2004]. Bei dem *PKHD1* Gen sind ca. 303 verschiedene Mutationen bekannt, wovon schätzungsweise 40% auf Abbruch und ca. 60% auf Missense-Mutationen beruhen. Die Missense-Mutation T36M macht ca. 17% aller Mutationen aus und ist relativ häufig in Europa [Harris 2009].

1.2.4 Das Genprodukt von *PKHD1*: Fibrocystin/Polyductin

PKHD1 kodiert für ein 4.074 Aminosäuren großes Transmembranprotein mit einem berechneten Molekulargewicht von 447 kDa, das wahlweise als Fibrocystin (FPC) oder Polyductin bezeichnet wird [Ward 2002, Onuchic 2002, Wang 2007]. Dieses Protein besteht wahrscheinlich aus einem 3.858 Aminosäuren umfassenden extrazellulären N-Terminus, einer Transmembrandomäne sowie einem kurzen intrazellulären C-Terminus [Ward 2002]. Strukturanalysen ergaben, dass der große extrazelluläre Anteil zwölf Immunglobulin-like-Plexin-Transkriptionsfaktoren (IPT) Domänen enthält [Onuchic 2002]. Das kurze C-terminale Ende enthält Domänen, die wahrscheinlich zu cAMP/cGMP-abhängigen Kinasen homolog sind [Menezes 2006]. Aufgrund von alternativem Spleißen scheinen von Polyductin eine Vielzahl von Varianten zu bestehen [Bergmann 2004, 2005]. In 2003 und 2004 gelang es unabhängigen Forschergruppen erstmals, FPC in den primären Zilien sowie in den Basalkörpern des Nierenepithels zu lokalisieren [Wang 2003, Ward 2003, Zhang 2004].

Zudem wurde entdeckt, dass das C-terminale Ende von Polyductin mit dem N-terminalen Ende von Polycystin-2 interagiert und dass ein Mangel an Polyductin zu einer verminderten Expression von *PKD2* führte, jedoch nicht umgekehrt. Auch zeigte sich ein schwereres Krankheitsbild, wenn bei den verwendeten Mäusen sowohl eine Mutation des *Pkh1* als auch des *Pkd2* Genes vorlag [Kim 2008]. Dennoch bleibt die genau Wirkungsweise von Polyductin weiterhin ungeklärt.



1.3 Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)

1.3.1 Klinik

Die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung gehört mit einer Prävalenz von 1:1.000 [Dalgaard 1957, Davies 1991] weltweit zu den häufigsten monogenetischen Erkrankungen des Menschen. Sie ist charakterisiert durch eine beidseitige Nierenvergrößerung mit multiplen Zysten. Dies führt zu einem zunehmenden Verlust der Nierenfunktion, so dass ca. 50% der betroffenen Patienten bis zum 60. Lebensjahr das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz erreichen [Gabow 1992]. Dies entspricht ca. 8 bis 10% aller Fälle von terminalem Nierenversagen in Europa und den USA [Zeier 1996]. Neben diesen Hauptmanifestationsformen (Nierenzysten und Niereninsuffizienz) der ADPKD bestehen zahlreiche extra-renale Manifestationen. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei ADPKD um eine systemische Erkrankung handelt [Perrone 1997]. Die wichtigsten renalen Komplikationen und extra-renalen Manifestationen der ADPKD seien im Folgenden kurz erwähnt:

- Renale Komplikationen

Bei ca. 60% aller Patienten mit ADPKD kommt es bereits vor Auftreten der Niereninsuffizienz zur Hypertonie [Gabow 1993], dem einerseits eine inadäquate Natriumausscheidung [Schmid 1990, Nash 1997], andererseits eine erhöhte Renin-Sekretion zu Grunde liegt [Chapmann 1990, Harrap 1991].

Ungefähr die Hälfte aller Patienten entwickelt im Verlauf der Erkrankungen mindestens einmal eine Pyelonephritis, wobei das weibliche Geschlecht etwas häufiger betroffen zu sein scheint. Aber auch Infektionen der Zysten durch Ausbreitung der Infektion per continuitatem oder durch hämatogene Streuung sind möglich [Sklar 1987, Schwenger 1999].

Die ADPKD führt bei bis zu 60% der Patienten zur Mikro- und Makrohämaturie [Grantham 2006], wobei häufig zusätzlich eine Proteinurie von unter einem Gramm pro Tag besteht [Klingel 1992].

Auch scheinen bei Patienten mit ADPKD Nierensteine ungefähr doppelt so häufig aufzutreten wie in der Normalbevölkerung, bei denen es sich vor allem um Harnsäuresteine und weniger um Calciumoxalatsteine zu handeln scheint [Torres 1993].

- Extra-renale Manifestationen

Mit einer Prävalenz von bis zu 90% sind Leberzysten die häufigsten extra-renalen Manifestationen der ADPKD [Thomsen 1998], wobei die Leberzysten bei Frauen wahrscheinlich aufgrund des Östrogens wesentlich stärker ausgeprägt zu sein scheinen [Gabow 1990, Niv 1997]. Durch das häufige, sekundäre Auftreten von Zysteninfektionen sowie sehr selten durch Malignomentstehung erreicht diese extra-renale Manifestation der ADPKD eine Mortalität bis zu 10% [Grunfeld 1995].

Des Weiteren wurden multiple, aber seltene Zystenbildungen im Pankreas, in den Samenblasen sowie im Bereich der Arachnoidea beschrieben [Harris 2009].

Etwas seltener als Leberzysten, aber mit einer wahrscheinlichen Prävalenz zwischen 30 bis 80% doch recht häufig, ist die ADPKD mit einer Divertikulose assoziiert [Sceff 1980, Kupin 1987].

Hirn-Basisarterienaneurysmen treten bei ca. 8 bis 10% aller Patienten mit ADPKD auf und sind damit ungefähr doppelt so häufig wie in der Normalbevölkerung [Rinkel 1998]. Neben den Folgen der terminalen Niereninsuffizienz stellt die Aneurysmaruptur eine der häufigsten Todesursachen bei Patienten mit ADPKD dar. Wichtig ist hierbei, dass die Aneurysmaruptur vor allem eine Komplikation bei jüngeren Patienten darstellt und meistens vor dem 50. Lebensjahr auftritt [Scievink 1992].

Daneben wurden aber auch Aneurysmen an Herzkratzgefäßen, der thorakalen und abdominalen Aorta sowie das gehäufte Auftreten von Aortendissektionen beschrieben. Auch scheint es eine Assoziation von ADPKD mit dem gehäuften Auftreten von Mitralklappenprolaps sowie Mital- und Aortenklappeninsuffizienz zu geben, wobei der genaue Zusammenhang noch ungeklärt ist [Schwenger 1999].

1.3.2 Genetik

1994 wurde erstmals vom Europäischen Konsortium für Polyzystische Nierenerkrankung über die Klonierung eines der beiden mit ADPKD assoziierten Gene, *PKD1*, berichtet [The European Polycystic Kidney Disease Consortium 1994]. Es ist auf dem kurzen Arm (16p13.3) von Chromosom 16 lokalisiert, was bereits 1985 von Reeders gezeigt wurde [Reeders 1985], und konnte vollständig sequenziert werden [Burn 1995]. Das zweite Gen, *PKD2*, wurde 1996 von der Forschergruppe um Stefan Somlo auf dem Chromosom 4 (4q21-q23) identifiziert [Mochizuki 1996].

ADPKD wird bei ca. 85% aller Patienten durch eine Mutation des *PKD1* Gens verursacht (ADPKD1) und nur zu ca. 15% durch eine Mutation des *PKD2* Gens (ADPKD2) [Rossetti

2007]. Während bei dem Großteil der Patienten mit ADPKD eine positive Familienanamnese vorhanden ist, weisen ca. 5% aller Patienten eine spontane, neu aufgetretene Mutation auf [Grantham 2008]. Erst 2008 wurde über zwei Fälle von ADPKD mit genetischem Mosaik berichtet [Connor 2008, Consugar 2008]. Jedoch nicht bei allen Patienten, die das klinische Bild der ADPKD zeigen, lassen sich molekulargenetisch Mutationen in *PKD1* bzw. *PKD2* nachweisen. Dies legt den Verdacht nahe, dass es möglicherweise noch ein bisher unentdecktes *PKD3* Gen geben könnte [Rizk 2008].

Zwar kommt es sowohl bei Mutationen des *PKD1* Gens als auch des *PKD2* Gens zu sehr ähnlichen klinischen Manifestationen, dennoch unterscheiden sie sich hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung. So führt ADPKD bei Patienten mit einer Mutation des *PKD1* Gens durchschnittlich im Alter von ungefähr 54 Jahren zur terminalen Niereninsuffizienz, während dies bei einer Mutation des *PKD2* Gens erst im Alter von ca. 74 Jahren, somit 20 Jahre später, der Fall ist [Hateboer 1999]. Dem schwereren Verlauf von ADPKD scheint eine früher auftretende große Anzahl an Zysten zu Grunde zu liegen, nicht jedoch eine beschleunigte Wachstumsrate dieser Zysten [Harris 2006].

Das *PKD1* Gen umfasst 46 Exone, ist 50 kbp lang und hat einen offenen Leserahmen von 12.909 Basenpaaren [International Polycystic Kidney Disease Consortium 1995, Hughes 1995]. Die molekular-genetische Untersuchung von *PKD1* wird dadurch erschwert, dass die am 5'-Ende gelegenen 33 Exone von *PKD1* in einer Region liegen, die insgesamt sechsmal auf dem Chromosom 16 vertreten ist [Harris 2009]. Dennoch wurde bisher über 314 verschiedene Deletionsmutationen in ca. 400 betroffenen Familien sowie über zahlreiche Missense-Mutationen berichtet [Harris 2009]. Darüber hinaus zeigte sich, dass Mutationen des *PKD1* Gens im Bereich des 5'-Endes zu einer schlechteren Prognose, verbunden mit einem früherem Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz sowie einem höheren Auftreten von intrakraniellen Aneurysmen, führen [Ong 2005].

Das *PKD2* Gen umfasst 15 Exone, ist 68 kbp lang und hat einen offenen Leserahmen von 2.904 Basenpaaren [Mochizuki 1996]. Inzwischen wurden in 166 Familien 91 Deletionsmutationen sowie zahlreiche Missense-Mutationen beschrieben [Harris 2009].

1.3.3 Das Genprodukt von *PKD1*: Polycystin-1 (PC1)

PKD1 kodiert für ein 4.302 Aminosäuren großes Protein, das Polycystin-1 (PC1) genannt wird. Dabei handelt es sich um ein integrales Plasmamembranprotein mit einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne (~3.109 Aminosäuren), 11 Transmembrandomänen (~993 Aminosäuren) sowie einem relativ kurzen, 200 Aminosäuren umfassenden, intrazellulären C-terminalen Ende [Hughes 1995, International Polycystic Kidney Disease Consortium 1995, Sandford 1997].

PC1 enthält in seinem extrazellulären Anteil 16 Immunglobulin-ähnliche PKD Domänen, die Polycystin-1 zu Protein-Protein- sowie zu Protein-Zucker-Interaktionen befähigen sollen [Hughes 1995, Sandford 1997, Ponting 1999]. Es besteht auch eine Interaktion des C-terminalen Endes von Polycystin-1 mit dem C-terminalen Ende von Polycystin-2 [Lakkis 2003, Qian 1997, Ibraghimiv-Beskrovnyaya 1997]. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass PC1 an der Ausbildung von Zell-Zell- sowie von Zell-Matrix-Kontakten beteiligt ist [Tsiokas 1997].

Darüber hinaus finden sich extrazellulär zwei Leucin-reiche Domänen, eine C-Typ Lectin Domäne, eine LDL-A verwandte Domäne sowie eine Region, die homolog ist mit dem suREJ Protein („sea urchin receptor for egg jelly“). Letztere Region erstreckt sich über ~1.000 Aminosäuren und befindet sich zwischen der letzten PKD Domäne und der ersten Transmembrandomäne [Sandford 1997]. Das eigentliche suREJ Protein ist normalerweise an dem Einstrom von Calcium-Ionen aus dem Extrazellulärraum beteiligt [Moy 1996].

Zusätzlich findet sich extrazellulär eine GPS („G protein-coupled receptor proteolytic site“) Domäne, an der Polycystin-1 gespalten wird, was wichtig für die Aktivierung des Proteins zu sein scheint [Qian 2002]. Aber auch eine Abspaltung des C-terminalen, intrazellulären Endes mit Wanderung zum Zellkern wird beschrieben [Chauvet 2004, Low 2006].

Polycystin-1 ist in fetalen Nieren vor allem in der Plasmamembran von Epithelzellen des distalen Nephrons sowie von Gefäßendothelzellen lokalisiert [van Adelsberg 1997, Ibraghimiv-Beskrovnyaya 1997]. Dagegen scheint es in den Nieren von erwachsenen Patienten vor allem intrazellulär lokalisiert zu sein [van Adelsberg 1997]. Aber auch eine Lokalisierung im Epithel der Gallengänge, im Pankreas, in der Brustdrüse und in den Astrozyten des Gehirns wurde beschrieben [Ibraghimiv-Beskrovnyaya 1997].

Inzwischen wurden auch Proteine entdeckt, die eine starke Ähnlichkeit mit PC1 aufweisen, so dass sie als PC1-like klassifiziert werden, hierbei handelt es sich um PC1L2, PC1L3 und PCREJ. Ob, oder inwieweit ein Zusammenhang mit ADPKD besteht, ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt [Pelucchi 2006, Ong 2005].

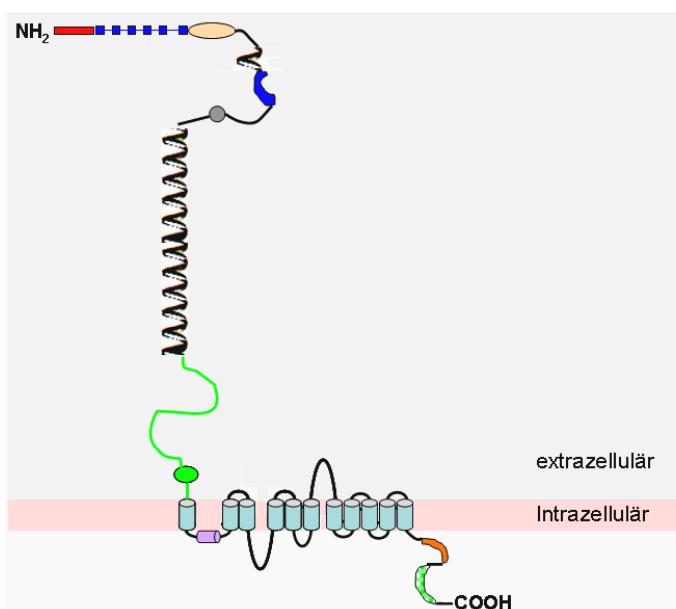


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von Polycystin-1 (in Anlehnung an Harris 2008).

- Signalpeptid
- Leucin-reiche Abschnitte
- WSC Domänen
- ~~~~ PKD Sequenzen
- ~~~~~ C-Typ Lectin
- LDL-A ähnlich
- ~~~~~ REJ-Modul
- GPS Domäne
- ~~~~~ Trans-Membran Region
- ~~~~~ PLAT Domäne
- ~~~~~ G-Protein Bindungsstelle
- ~~~~~ Coiled coil Domäne

1.3.4 Das Genprodukt von PKD2: Polycystin-2 (PC2)

PKD2 kodiert für ein 968 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von ~110 kDa [Hackmann 2005], das Polycystin-2 (PC2) genannt wird. Es besitzt sechs Transmembrandomänen, die eine gewisse Ähnlichkeit mit den letzten 6 Transmembrandomänen von Polycystin-1 aufweisen [Mochizuki 1996, Sandford 1997]. Sowohl das C-terminale Ende als auch das N-terminale Ende liegen intrazellulär [Mochizuki 1996].

Es wird heute davon ausgegangen, dass es sich bei Polycystin-2 um einen nicht selektiven Kationenkanal handelt, der durch Ca-Ionen moduliert wird [Vassilev 2001, Gonzalez-Perrett 2002]. Der Transport von Ca-Ionen durch den Kationenkanal konnte nachgewiesen werden [Koulen 2002, Gonzalez-Perrett 2001].

Darüber hinaus weist Polycystin-2 eine gewisse Ähnlichkeit mit den TRP („transient receptor potential“) Kationen-Kanälen auf und bildet zusammen mit Polycystin-1 eine eigene Untergruppe (TRPP) [Montell 2001, Koulen 2002].

Es wurde für Polycystin-2 sowohl eine Lokalisation in der Zellmembran [Hanaoka 2000, Luo 2003] als auch eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum/Golgi-Apparat beschrieben [Cai 1999, Koulen 2002]. Zudem soll es auch an der basolateralen Zellseite lokalisiert sein [Obara 2006, Foggensteiner 2000]. Für die Positionierung von PC2 im endoplasmatischen Retikulum scheint eine 34-Aminosäuren umfassende Domäne im Bereich des C-terminalen Endes verantwortlich zu sein, die wahrscheinlich mehrere Phosphorylierungsstellen aufweist [Cai 1999]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Domäne das PACS-1 Protein („phosphofuran acidic cluster sorting protein-1“) bindet, das für den retrograden Transport und den Verbleib von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich ist [Kottgen 2005, Wan 1998]. Die Hauptfunktion von PC2 im endoplasmatischen Retikulum scheint jedoch eine intrazelluläre Freisetzung von Ca-Ionen zu sein [Koulen 2002].

PC2 scheint auch in der Lage zu sein, sich mit weiteren PC2-Proteinen zu Multimeren zusammenzulagern [Qian 1997].

Inzwischen wurden auch Proteine entdeckt, die eine starke Ähnlichkeit mit PC2 aufweisen, so dass sie als PC2-like klassifiziert werden, hierbei handelt es sich um PCL und PC2L2 [Pelucchi 2006, Ong 2005]. Diese scheinen jedoch nicht mit ADPKD assoziiert zu sein.

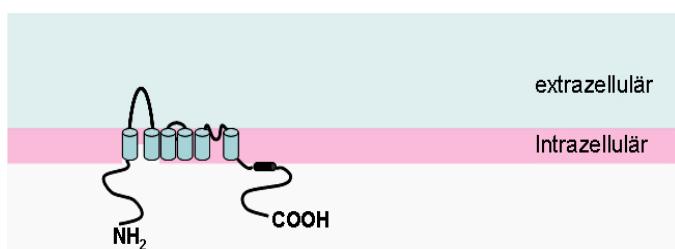


Abb. 1.3: Schematische Darstellung von Polycystin-2 (in Anlehnung an Harris 2008).

- EF-hand
- Trans-Membran Region

1.3.5 Die Funktion von Polycystin-1 und Polycystin-2

Da Polycystin-1 und Polycystin-2 Strukturähnlichkeiten aufweisen, sie direkt miteinander interagieren können und Mutationen in den beiden Genen zu sehr ähnlichen klinischen Manifestationen führen, scheint es folgerichtig, dass sie einen gemeinsamen Transduktionsweg besitzen müssen [Wu 2001, Hackmann 2005]. In diesem Zusammenhang wird auch oftmals vom „Polycystin-Komplex“ gesprochen.

Darüber hinaus wurde entdeckt, dass Polycystin-1 und Polycystin-2 in primären Zilien von Tubulusepithelzellen co-lokalisiert sind [Nauli 2003, Yoder 2002]. Da dies eine entscheidende Rolle bei der Funktion von PC1 und PC2 spielt, soll kurz näher auf das primäre Zilium eingegangen werden.

Das primäre Zilium ist ein nicht selbständige bewegliches Zilium, das aus neun peripher angeordneten Paaren von Mikrotubuli besteht [Praetorius 2005]. Es entwickelt sich aus einer modifizierten mütterlichen Zentriole, dem Basalkörper, der die intrazelluläre Basis des primären Ziliums bildet. Es ist auf der apikalen Oberfläche der Tubulusepithelzellen lokalisiert und scheint als Chemo- oder Mechano-Sensor zu dienen. Ein Modell besagt, dass das Zilium durch den Fluss im tubulären Lumen gebeugt wird. Diese mechanische Beugung wird von dem extrazellulären Anteil von Polycystin-1 erkannt, das durch Interaktion mit PC2 einen Ca^{2+} -Einstrom durch die Zellmembran ins Zellinnere bewirkt. Zusätzlich dazu soll es zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum kommen und der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel eine Signalkaskade aktivieren, die verschiedene zelluläre Funktionen betrifft [Rizk 2008, Nauli 2003].

Außerdem soll als Folge des mechanischen Stimulus die proteolytische Abspaltung des C-terminalen Endes von PC1 und der Transport dieses Spaltprodukts zum Zellkern erfolgen. Das Spaltprodukt soll mit dem Signal-Überträger und Transkriptionsaktivator STAT6 sowie dem Co-Aktivator P100 interagieren und die STAT6-abhängige Genexpression stimulieren. Somit würde PC1 als Vermittler zwischen einem mechanischem Reiz und Veränderungen in der Genexpression dienen [Low 2006, Menesez 2006].

1.3.6 Zystenbildung bei ADPKD

Heute wird davon ausgegangen, dass in vielen Zysten beide Allele von *PKD1* bzw. *PKD2* betroffen sein müssen, damit es zum klinischen Bild der ADPKD kommt [Pei 1999]. Hierbei ist das erste mutierte Allel geerbt, während das zweite, zunächst normale Allel durch erworbene somatische Einflüsse geschädigt wird. Diese „Zwei-Hit“-Theorie konnte dadurch bewiesen werden, dass aus menschlichen Proben gewonnene Zystenepithelien klonalen Ursprungs waren und einen Verlust der Heterozygotität aufwiesen [Ong 1997, Sutters 2003].

Während homozygote Mäuse mit Mutationen in *Pkd1* bzw. *Pkd2* normalerweise zwischen E12.5-16.5 sterben und massiv vergrößerte Zystennieren aufweisen [Lu 1997, Harris 2009], sind heterozygote Mäuse lebensfähig und weisen deutlich weniger Zysten sowie einen späteren Zeitpunkt der Zystenbildung auf [Lu 1999]. Es konnte in Tiermodellen auch gezeigt werden, dass PC1 nicht vollständig verloren gehen muss, sondern eine Reduktion des Proteins bereits ausreichend ist, um zur Zystenbildung zu führen [Lantinga-van-Leeuwen 2004]. Zudem scheint auch der Zeitpunkt des PC1 oder PC2 Verlustes eine wichtige Rolle zu spielen. Dies zeigt sich daran, dass die Inaktivierung von *Pkd1* vor dem 13. postnatalen Tag

zu einem wesentlich schwereren und rascher progredienten Krankheitsverlauf führt als eine spätere Inaktivierung. Möglicherweise spielt hier eine Herunterregulierung des Proteins während der Entwicklung eine Rolle [Lantinga-van Leeuwen 2007, Piontek 2007].

Kommt es nun zur Mutation von Polycystin-1 bzw. Polycystin-2, verlieren die Tubulusepithelzellen die unter 1.3.5 beschriebene Fähigkeit, den mechanischen Reiz der Beugung des primären Ziliums in einen intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom umzuwandeln. Dies liegt daran, dass bei Mutationen von PC1 die mechano-sensorische Funktion ausfällt und somit keine Aktivierung von PC2 erfolgt, die zu besagtem Ca^{2+} -Einstrom führt, während bei einer Mutation von PC2 der Ionenkanal selbst betroffen ist. Dieser erniedrigte Ca^{2+} -Spiegel scheint zu einer Erhöhung von cAMP zu führen, das in normalen Zellen als Wachstumsinhibitor wirkt. In Zellen mit PKD hingegen scheint cAMP als Wachstumsfaktor zu agieren, indem es den MAPK/ERK („extracellular-regulated protein kinase“) Signalweg stimuliert, der von Src, Ras und B-Raf abhängig ist [Yamaguchi 2000, 2003, 2004, 2005]. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Zellproliferation [Belibi 2004, Torres 2004].

Für eine erhöhte Zellproliferation in Zellen mit PKD scheint aber auch ein erhöhter Spiegel an mTOR („mammalian target of rapamycin“) verantwortlich zu sein. mTOR stimuliert das Zell-Wachstum sowie die Zellproliferation und wird in Zellen von Erwachsenen normalerweise durch Tuberin inhibiert, während Nierenzellen postnatal eine hohe Aktivität von mTOR aufweisen. PC1 scheint direkt mit Tuberin, dem Genprodukt des *TSC2* Gens („tuberous sclerosis gene“) sowie mit mTOR interagieren zu können. Darüber hinaus scheint PC1 mTOR auch indirekt regulieren zu können [Shillingford 2006], wobei es durch eine Mutation in PC1 zu einer Dysregulation und einer Erhöhung von mTOR kommt [Torra 2008]. Dass mTOR eine wichtige Rolle in der Zystenentwicklung durch Zellproliferation spielt, zeigt sich auch daran, dass Patienten, die sowohl eine Mutation in *PKD1* als auch in *TSC2* zeigen, einen besonders schweren Krankheitsverlauf aufweisen [Harris 2009, Sampson 1997].

Darüber hinaus scheint auch eine gestörte Zell-Matrix und Zell-Zell-Interaktion eine wesentliche Rolle in der Ausbildung von Zysten zu spielen. PC1 wurde im Bereich der Desmosomen gefunden und scheint in Zellen mit PKD mitverantwortlich zu sein, dass die Proteine der Desmosomen von ihrer normalen Lokalisation an der lateralen Plasmamembran in das Zytoplasma wandern. Somit verhindert eine Mutation in PC1 die korrekte Ausbildung von Desmosomen und trägt damit wesentlich zu einem gestörten Zell-Zell-Kontakt bei [Russo 2005]. Zellen mit PKD weisen zusätzlich dazu eine erhöhte Adhärenz zu Kollagen Typ I und IV auf [Wilson 2004].

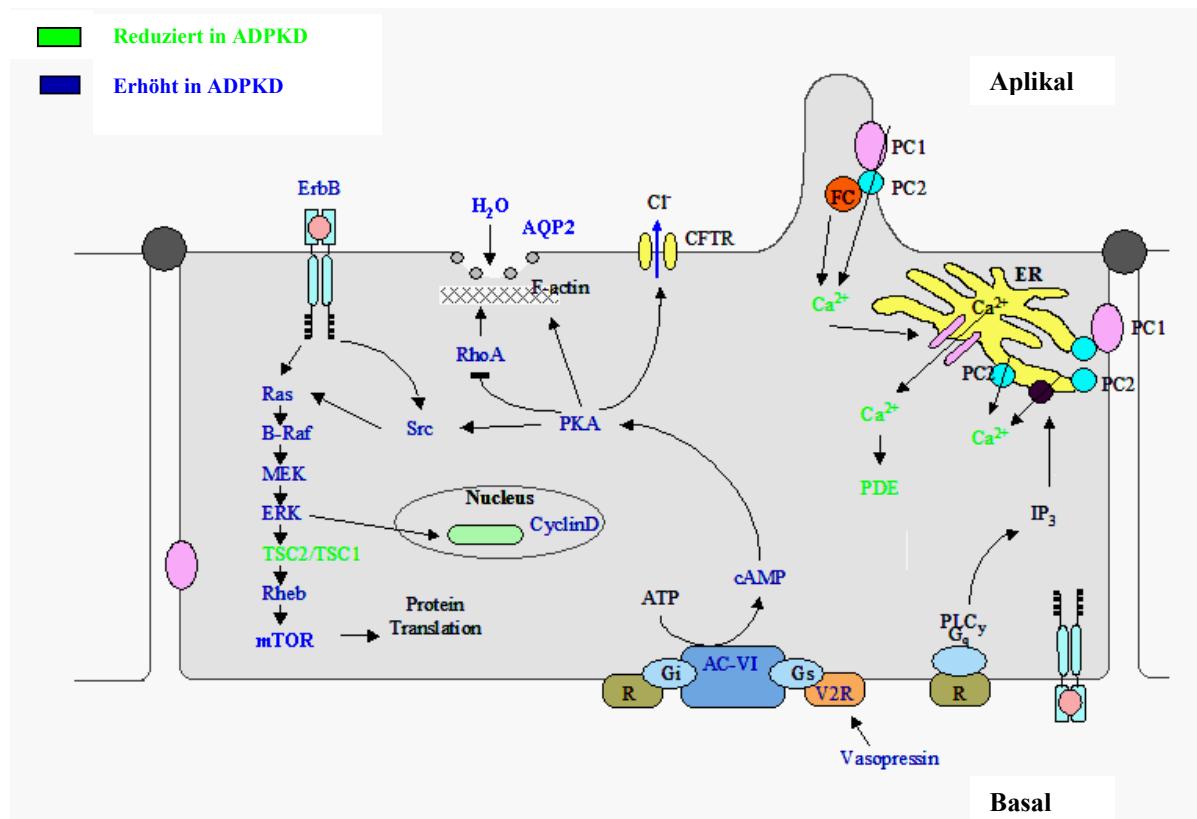


Abb. 1.4: Angenommene zelluläre Veränderungen in polyzystischen Nierenzellen (modifiziert nach Harris 2009 und Torra 2008). In Zellen mit ADPKD kommt es aufgrund des fehlerhaft funktionierenden PC1/PC2 Komplexes zu einem reduzierten Ca²⁺-Einstrom in die Zelle sowie zu einer reduzierten Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Die in den Sammelrohren vorkommende Adenylylzyklase 6 (AC-VI) wird über G-Proteine stimuliert und durch intrazelluläres Ca²⁺ gehemmt. Dies führt in Zellen mit ADPKD zu einem erhöhten cAMP, das zu einer Aktivierung der Ras Kaskade führt. Die daraus resultierende Aktivierung von mTOR führt zu einer erhöhten Proteintranslation. Zugleich bewirkt die cAMP Erhöhung über eine Stimulation des CFTR Ionenkanals einen Cl⁻-Ausstrom aus der Zelle und eine Hemmung von RhoA, was zu einer Erleichterung des Einbaus von Aquaporin-2 (AQP2) in der apikalen Zellmembran führt, da die Polymerisierung von F-Aktin herabgesetzt ist.

1.3.7 Diagnostik bei ADPKD

Die Methode der Wahl ist bis heute die Sonographie der Nieren. Als Entscheidungshilfe für das Vorliegen einer ADPKD1 spielen die Ravine-Kriterien eine wichtige Rolle. Dadurch kann man beispielsweise bei einem unter 30jährigen Patienten mit entsprechender Familienanamnese bei Auffinden zweier Nierenzysten (uni- oder bilateral) eine ADPKD diagnostizieren [Ravine 1994]. Ähnliches soll auch bei Patienten mit ADPKD2 gelten [Demetriou 2000]. Die Sensitivität des Ultraschalls für ADPKD soll beispielsweise bei Kindern mit positiver Familienanamnese bei 77% und die Spezifität bei 98% liegen [Gabow 1997].

Zwar konnten in den letzten Jahren zahlreiche verschiedene Mutationen in *PKD1* und *PKD2* durch direkte Sequenzierung und Gen-Kopplungsanalyse nachgewiesen werden, dennoch hat sich ein obligates Screening für Risikopatienten bisher nicht durchgesetzt. Dies mag bei *PKD1* daran liegen, dass sich das Auffinden der Mutation durch die Vielzahl von ähnlichen Genen oftmals als schwierig gestaltet [Ong 2005]. Dennoch stellt die molekulardiagnostische Diagnostik ein unverzichtbares Hilfsmittel dar, wenn die sonographischen Ergebnisse

widersprüchlich sind oder wenn es um entscheidende Maßnahmen geht, wie z.B. eine Organspende bei einem Patienten mit ADPKD-positiver Familienanamnese [Rizk 2008].

Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt bei den zwischen 1950 und 1974 geborenen Patienten 27 Jahre, während es bei Patienten, die vor 1950 geboren wurden, noch ein Durchschnittsalter von 39 Jahren war [Taylor 2005].

1.3.8 Therapie bei ADPKD

Neben der Therapie der Komplikationen von ADPKD, auf die mit Ausnahme der Hypertonie nicht weiter eingegangen werden soll, wird aktuell in klinischen Studien versucht, Zystenbildung und -wachstum zu verhindern. Zur Kontrolle für die Effektivität einer therapeutischen Maßnahme wird heute die Größenprogredienz der Nieren im MRT herangezogen, nachdem sich dies als die beste Methode in der Multizenterstudie CRISP („Consortium for Radiologic Studies of Polycystic Kidney Disease“) erwiesen hat [Torra 2008]. Im Folgenden sind einige der aktuellen therapeutischen Versuche erwähnt:

- ACE-Hemmer/AT1-Hemmer

Eine Therapie der Hypertonie ist deswegen von entscheidender Bedeutung, da sie mitunter einen wichtigen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt und eine wichtige Rolle bei der Morbidität und Mortalität der Patienten spielt. Aktuell wird hierfür in der 2006 begonnenen und noch laufenden HALT-PKD Studie, einer randomisierten, doppel-blinden, Placebo-kontrollierten Phase III Multizenterstudie, überprüft, ob ein signifikanter Vorteil einer Kombination aus ACE-Hemmer und AT1-Hemmer gegenüber einem ACE-Hemmer alleine besteht, wenn neben der Hypertonie-Therapie auch das Zystenwachstum günstig beeinflusst werden soll. Zusätzlich dazu wird in der HALT-PKD Studie auch untersucht, ob die Einstellung der Blutdruckwerte unter 110/75 mm Hg im Gegensatz zu < 120-130/70-80 mm Hg einen günstigen Einfluss aufweist [Harris 2009, Rizk 2008].

- Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten

Vasopressin stimuliert in den Zellen der distalen Tubuli sowie der Sammelrohre die Vasopressin-2-Rezeptoren (V2). Diese sind an ein G-Protein gebunden, das die cAMP Produktion stimuliert, was wiederum bekanntlich über Anregung der Zellproliferation entscheidend zur Zystenbildung beiträgt. Durch Inhibition der V2-Rezeptoren wird versucht, der Zystenbildung entgegen zu wirken. Eine hierfür durchgeföhrte klinische Studie in der Phase II mit Tolvaptan (TEMPO 2/4) zeigte hierbei viel versprechende Resultate bei einer Dosierung zwischen 60-480 mg täglich. Aktuell wird Tolvaptan in einer Dosierung zwischen 60-120 mg in einer doppel-blinden, Placebo-kontrollierten Phase III Multizenterstudie (TEMPO 3/4) untersucht. Die Studie wurde im März 2007 begonnen und soll 1.500 Patienten mit ADPKD im Alter von 18-50 Jahren mit einer GFR > 60 ml/min/1,73 m² und einem Nierenvolumen > 750 ml umfassen. Das Ende der Patientenrekrutierung wird auf 2011 geschätzt [Torra 2008, Harris 2009].

- Somatostatin-Analoga

Eine weitere Möglichkeit, das Zystenwachstum in der Niere günstig zu beeinflussen, geschieht mit Hilfe von Somatostatin. Somatostatin bindet in der Niere und der Leber an den

Somatostatin-2-Rezeptor (SST2) und bewirkt darüber eine Abnahme des intrazellulären cAMP-Spiegels. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit ADPKD und einem Somatostatin produzierenden Adenom zu einer Verkleinerung des Nierenvolumens kam [Ruggenenti 2005]. Aktuell wird das lang-wirksame Somatostatin-Analogon Octreotid in einer randomisierten, einfach-blinden, Placebo-kontrollierten Phase III Studie vom Mario Negri Institut getestet. Die Patientenrekrutierung begann 2006 und soll voraussichtlich 2010 beendet sein. Es sollen 66 Patienten zwischen 18-75 Jahren und einer GFR > 40 ml/min/1,73 m² eingeschlossen werden. Als Endpunkt gilt die Veränderung der Nierengröße im MRT. Zusätzlich dazu läuft eine Phase II und III Studie in der Mayo Clinic, um die Wirkung von Octreotid an Patienten mit schwerer polyzystischer Lebererkrankung (PCL) zu testen. Dies ist eine randomisierte, doppel-blind, Placebo-kontrollierte Studie mit Crossover, bei der im Zeitraum von 2007-2010 42 Patienten über 18 Jahren mit schwerer symptomatischer PCL oder einem Lebervolumen > 4.000 ml eingeschlossen werden sollen [Torra 2008, Harris 2009].

- mTOR-Inhibitoren

Da die Aktivierung des mTOR Stoffwechselpfades eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression der Nierenzysten zu spielen scheint, erscheint eine Inhibition von mTOR als ein sinnvoller therapeutischer Schritt. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von mTOR zu einer Reduktion des Nierenvolumens führte [Wahl 2006, Tao 2005]. Auch wurde beobachtet, dass es bei einer Immunsuppression mit Sirolimus nach Nierentransplantation zu einer Größenreduktion der eigenen Niere kam [Shillingford 2006, Qian 2008]. Diese Erkenntnisse führten dazu, dass aktuell 3 Studien mit Sirolimus laufen. Die erste ist die 2006 begonnene Suisse Studie, eine randomisierte, einfach-blind, Placebo-kontrollierte Phase III Multizenterstudie an der Universität Zürich, die 100 Patienten zwischen 19-40 Jahren mit einer GFR ≥ 70 ml/min/1,73 m² umfassen soll. Die zweite ist die 2007 begonnene und voraussichtlich bis 2009 dauernde SIRENA Studie. Diese ist eine vom Mario Negri Institut durchgeführte, randomisierte, open-label Phase II Studie mit Crossover, in der 16 Patienten zwischen 18 und 80 Jahren mit einer GFR ≥ 70 ml/min/1,73 m² erfasst werden sollen. Die dritte Studie ist eine von der Cleveland Clinic 2006 begonnene randomisierte, open-label Phase I-II Studie, in der unterschiedliche Dosierungen von Sirolimus verglichen werden sollen. In dieser Studie sollen 45 Patienten zwischen 18-75 Jahren eingeschlossen und die Veränderung der GFR beurteilt werden. Die Rekrutierung der Patienten soll voraussichtlich 2009 beendet sein.

Neben den Studien mit Sirolimus läuft in Deutschland aktuell auch eine randomisierte, doppel-blind, Placebo-kontrollierte Phase III Multizenterstudie mit Everolimus. Dies ist ein Makrolid, das über Bindung an das Protein FKBP mTOR inhibiert. Die Studie wurde 2006 begonnen und soll bis 2009 400 Patienten zwischen 18 und 65 Jahren mit einer GFR ≥ 60 ml/min umfassen. Zur Beurteilung der Resultate wird die Größenveränderung der Nieren im MRT herangezogen [Torra 2008, Harris 2009].

- Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren

Bei Roscovitine handelt es sich um einen Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitor, der einen Zellzyklusarrest bewirkt und in Zellen mit PKD sowohl den cAMP-Spiegel als auch Aquaporin-2 senken soll [Torra 2008].

- Triptolid

Das aus einer chinesischen Pflanze gewonnene Triptolid bewirkt abhängig von seiner Dosierung einen Zellzyklusarrest. In vitro Studien lassen vermuten, dass Triptolid an PC2 bindet und es dadurch zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} kommt [Leuenroth 2007, Torra 2008].

- EGFR-Inhibitoren

Es konnte gezeigt werden, dass es bei PKD zu einer Aktivierung von EGF („epidermal growth factor“) kommt, der die Zellproliferation und Zystenbildung stimuliert. Mittels EGFR („epidermal growth factor receptor“) Inhibitoren konnte der Zystenbildung im Tiermodell erfolgreich entgegen gewirkt werden [Torres 2003].

Neben diesen erwähnten Möglichkeiten der Therapie von ADPKD bieten aber auch beispielsweise kleine Moleküle, die die Zystenbildung inhibieren sollen [Ibraghimov-Beskrovna 2007] oder VEGF („vascular endothelial growth factor“) Inhibitoren, die im Tiermodell die Zystenentwicklung verlangsamen konnten [Tao 2007], vielleicht zukünftige therapeutische Optionen.

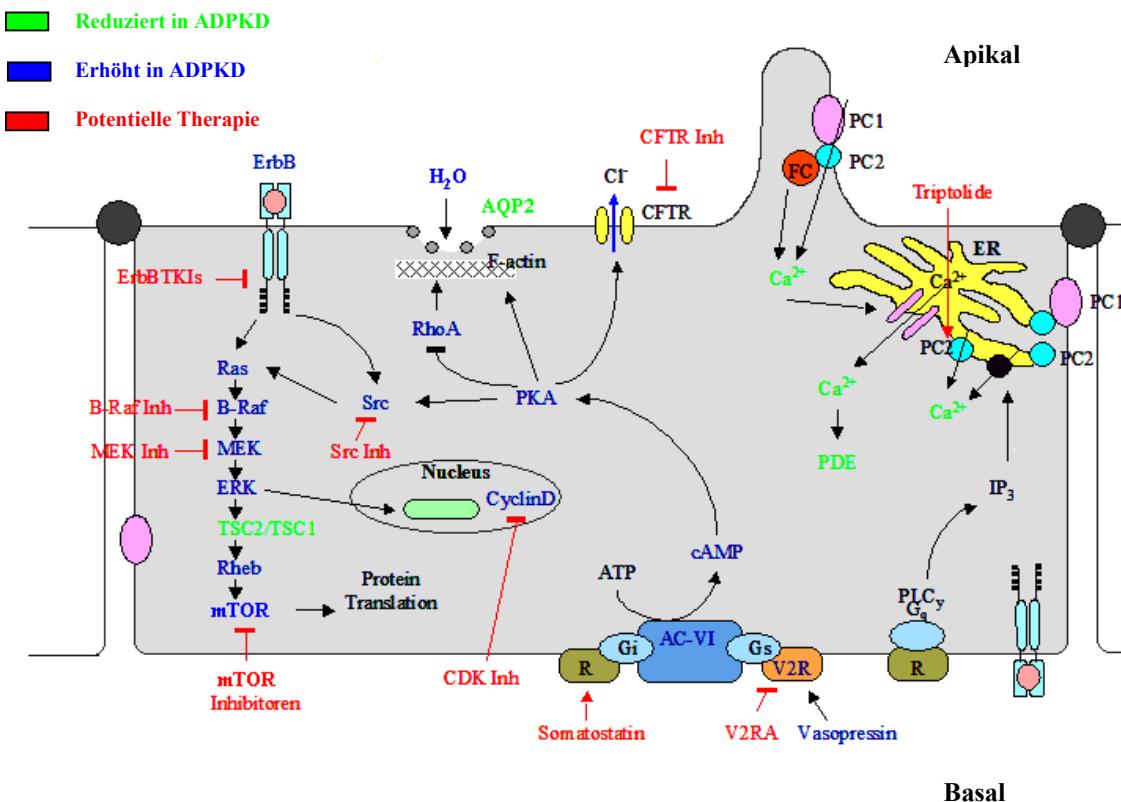


Abb. 1.5: Angenommene zelluläre Veränderungen in polyzystischen Nierenzellen und potentielle Therapieansätze (modifiziert nach Harris 2009 und Torra 2008). In Zellen mit ADPKD kommt es aufgrund des fehlerhaft funktionierenden PC1/PC2 Komplexes zu einem reduzierten Ca²⁺-Einstrom in die Zelle sowie zu einer reduzierten Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Die in den Sammelrohren vorkommende Adenylylzyklase 6 (AC-VI) wird über G-Proteine stimuliert und durch intrazelluläres Ca²⁺ gehemmt. Dies führt in Zellen mit ADPKD zu einem erhöhten cAMP-Spiegel, der zu einer Aktivierung der Ras Kaskade führt. Hier bieten Somatostatin- und Vasopressin-2-Rezeptor-Antagonisten möglicherweise einen therapeutischen Ansatzpunkt, indem sie den intrazellulären cAMP-Spiegel senken. Daneben gibt es auch

Studien mit Triptoliden, die durch eine verstärkte Freisetzung von Ca-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum wirken sollen. Weiterhin wird mit mTOR-Inhibitoren, Src-Inhibitoren, B-Raf-Inhibitoren sowie mit MEK-Inhibitoren eine Senkung der Proteintranslation bewirkt. Die Zugabe Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitoren soll zu einem Zellzyklusarrest führen.

1.4 Herstellung monoklonaler Antikörper früher und heute

1.4.1 Geschichte der monoklonalen Antikörperherstellung

Die Grundlage für die heute vielfach verwendete Methode der monoklonalen Antikörperherstellung bilden die Forschungsergebnisse des deutschen Immunologen Georges J. F. Köhler sowie seines Kollegen César Milstein.

Einige der wichtigsten Anforderungen, die sie hierbei an die Technik als auch an die Antikörper an sich stellten, waren:

1. Um den Ansprüchen eines monoklonalen Antikörpers zu genügen, musste definitionsgemäß jeder Klon aus einer einzigen Zelle hervorgehen und durfte nur genau einen Antikörper produzieren, der genau gegen ein Epitop gerichtet war.
2. Der Antikörper sollte in unbegrenzter Anzahl zur Verfügung stehen, was eine unsterbliche Zelllinie voraussetzte.

Bereits 1975 veröffentlichten Georges J. F. Köhler und César Milstein ihre gemeinsamen Ergebnisse in *Nature* unter dem Titel „*Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*“. Hierin beschrieben sie, wie es ihnen gelang, mittels Fusion von Mäusemilzzellen mit einer Myelomzelllinie eine stabile Hybridomzellline zu erschaffen, die Antikörper gegen Schafsserythrozyten produzierte.

Im Vorfeld dazu diente als Test die Fusion zweier Myelomzelllinien, die von BALB/c Mäusen abstammten. Die erste Zelllinie war P1Bul, die nicht im Selektionsmedium HAT wächst, aber resistent gegenüber 5-Bromo-2'-desoxyuridin ist und den Antikörper Adj PC5, ein IgG2a, synthetisiert. Die zweite Zelllinie war P3-X63Ag8, die ebenfalls nicht im Selektionsmedium HAT wächst, gegen 8-Azaguanin resistent ist und den Antikörper MOPC21, ein IgG1, synthetisiert. Mit Hilfe des inaktivierten Sendai Virus [Harris 1965], der in der Lage ist, multinukleäre Zellen durch Verschmelzung einzelner Zellen zu bilden, wurden die Zellen der beiden Myelomzelllinien im Verhältnis 1:1 miteinander fusioniert. Durch Kultivierung im Selektionsmedium HAT konnte sichergestellt werden, dass nur wirklich fusionierte Klone, sog. Hybridomzellen, überlebten. Denn nur, wenn die Zelle sowohl die Resistenz gegenüber 5-Bromo-2'-desoxyuridin als auch gegen 8-Azaguanin aufwies, blieb sie im Selektionsmedium HAT teilungsfähig. Um dies auch zu beweisen, wurden 5 Monate nach erfolgreicher Fusion die Karyotypen der einzelnen Klone untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Chromosomenzahl der Hybridomzellen [(Hy-B (P1-P3)] unter der Summe der Chromosomenzahlen der Ausgangszelllinien lag. So lag der Durchschnittswert der Chromosomen der Hybridomzellen bei 106, der Zelllinie P1Bul bei 55 und der Zelllinie P3-X63Ag8 bei 65. In der isoelektrischen Fokusierung zeigte sich, dass die Hybridomzelllinien nicht nur die Immunglobuline der Ausgangszelllinien produzierten, sondern darüber hinaus auch „neue“ Immunglobuline. Es konnte gezeigt werden, dass diese „neuen“ Immunglobuline aus einer Kombination der leichten und schweren Ketten der Ausgangszelllinien bestanden.

Nach diesen Vorversuchen begannen Köhler und Milstein BALB/c Mäuse gegen Schafserthrozyten zu immunisieren. Dazu erfolgte eine Grundimmunisierung mit Schafserthrozyten sowie ein Boost einen Monat später, weitere vier Tage später wurde die Mäusemilz entnommen. 10^8 Milzzellen wurden mit 10^7 Myelomzellen der Zelllinie P3-X67Ag8 mit Hilfe des inaktivierten Sendai Virus fusioniert. Die Zellen wurden die ersten acht Tage zur Selektion der fusionierten Hybridomzellen im HAT Medium kultiviert. Die Besonderheit des Selektionsmediums HAT ist, dass es Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. Aminopterin blockiert den normalen Weg der DNA Synthese in den Zellen, so dass nur noch Zellen teilungsfähig sind, die über einen alternativen Weg der DNA Synthese mittels des Enzyms Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HPRT) verfügen. Die Mäusemilzzellen verfügen über das entsprechende Enzym, sind allerdings in der Zellkultur nicht teilungs- und nur sehr beschränkt überlebensfähig. Die Zellen der Zelllinie P3-X67Ag8 verfügen nicht über HPRT, sind dafür allerdings in „normalem“ Kulturmedium teilungs- und überlebensfähig. So musste eine Zelle, um im HAT Medium zu überleben und sich zu teilen, die Eigenschaften beider Zelllinien aufweisen. Nach Abschluss der Selektion wurde anschließend auf DMEM, dem Hypoxanthin und Thymidin zugesetzt wurde, gewechselt. Drei Wochen später wurden die Klone mittels direktem Plaque Assay untersucht. Hierbei zeigten sich 33/1.086 (~3%) Klone positiv, da sie Antikörper gegen Schafserthrozyten produzierten und diese hämolysieren konnten. Zudem konnte mittels indirektem Plaque Assay die Produktion von MOPC21 in den Hybridomzellen nachgewiesen werden, welches von den ursprünglichen Myelomzellen stammt. Als weiterer Beweis der Fusion wurden nach 4 Monaten die Karyotypen der Hybridomzellen bestimmt. Diese lagen über der doppelten Chromosomenzahl der Milzzellen, aber unter der doppelten Chromosomenzahl der Myelomzellen. Zur Erfüllung der Definition „monoklonal“ durften die produzierten Antikörper jedoch nur von einer einzigen Zelle abstammen. Um dies zu gewährleisten, wurden Zellen der Klone vereinzelt, was heute auch unter dem Begriff Subklonierung verstanden wird. Zur Erhöhung der statistischen Wahrscheinlichkeit, einen Klon aus nur einer einzigen Zelle zu erhalten, vereinzelten Köhler und Milstein die dadurch entstandenen Subklone erneut.

Als Ergebnis dieser Arbeit entstanden Hybridomzellen, die Antikörper gegen Schafserthrozyten produzierten und nun in Zellkultur überlebens- und teilungsfähig waren. Zudem zeigte sich, dass die Injektion der Hybridomzellen in gesunde BALB/c Mäuse zur Ausbildung von Tumoren führte, die Antikörper gegen Schafserthrozyten produzierten. Allerdings stellte sich auch heraus, dass von diesen Zellen neue Immunglobuline gebildet wurden, die aus einer zufälligen Kombination der schweren und leichten Ketten des gegen die Schafserthrozyten gerichteten Antikörpers und des IgG1, das von der Ausgangs-Myelomzelllinie produziert wurde, bestanden. Georges J. F. Köhler und César Milstein folgerten daraus, sollte wirklich nur der erwünschte Antikörper produziert werden, wäre es notwendig, eine Myelomzelllinie ohne eigene Immunglobulin Produktion bzw. Sekretion zu verwenden.

Nach weiterer intensiver Forschung gelang es ihnen, ihre Ergebnisse in *Nature* unter dem Titel „*Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*“ zu veröffentlichen. Hier verwendeten sie die neue Myelomzelllinie NSI/1-Ag4-1, die eine nicht zur Sekretion der schweren Ketten von MOPC21 fähige Variante der ursprünglichen P3-X67Ag8 Zelllinie war.

1984 wurden Köhler und Milstein zusammen mit ihrem Kollegen, dem dänischen Immunologen Niels K. Jerne, für ihre Verdienste um die Erforschung und die Entwicklung der Technik der monoklonalen Antikörperherstellung der Nobelpreis in Physiologie oder Medizin verliehen.

1.4.2 Monoklonale Antikörperherstellung heute

Über 30 Jahre später hat sich die von Georges J. F. Köhler und César Milstein entwickelte Technik der monoklonalen Antikörperherstellung in ihren Grundlagen nicht geändert. Lediglich die Materialien und Screeningmethoden der antikörperproduzierenden Hybridomzellen haben sich gewandelt.

So wurde von Köhler und Milstein 1976 Freunds Adjuvans verwendet, ein Adjuvans bestehend aus inaktiviertem *Mycobakterium tuberculosis*, um den Immunisierungseffekt der Mäuse zu verstärken, während im Rahmen dieser Doktorarbeit auf das „schonendere“ Adjuvans Titermax Classic (Sigma-Aldrich) zurückgegriffen wurde. Auch wurde anstelle der intraperitonealen Injektion und des von Köhler und Milstein verwendeten einzigen Boosts nach einem Monat eine subkutane Grundimmunisierung, zwei Boosts im Abstand von 3 Wochen subkutan sowie ein dritter Boost intraperitoneal nach weiteren 3 Wochen durchgeführt. Zusätzlich wurde auch zur Erfolgskontrolle der Immunisierung Mäuseserum gewonnen und auf das Vorliegen spezifischer Antikörper untersucht. Die Fusion erfolgte am fünften Tag nach dem letzten Boost wie in der 1976 von Georges J. F. Köhler und César Milstein veröffentlichten Arbeit [Köhler 1976].

Sowohl die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet Myelomzelllinie X63Ag8.6.5.3, die keine Immunglobuline produziert, als auch die Zellfusion mittels Polyethylenglykol (PEG) anstelle des inaktivierten Sendai Virus entsprechen den von Georges J. F. Köhler verwendeten Materialien, die er in seinem Nobelpreisvortrag vom 8. Dezember 1984 beschrieb [Köhler 1984]. Die Milzzellen wurden mit den Myelomzellen in dieser Arbeit in einem Verhältnis von 1:3 (Milzzellen:Myelomzellen) fusioniert, das im Bereich der von Köhler und Milstein verwendeten Verhältnis von 1:2-10 liegt. Als Selektionsmedium wurde ähnlich historischem Vorbild HAT-Medium verwendet und nach kurzer Zeit auf ein Hypoxanthin und Thymidin enthaltendes Medium gewechselt.

Um die Monoklonalität zu gewährleisten, wurden die Hybridomzellklone ähnlich wie bei Georges J. F. Köhler und César Milstein zwei Subklonierungen unterzogen. Allerdings wurden die Hybridomzellklone nicht mehr wie 1975 mittels direktem und indirektem Plaque Assay, bzw. isoelektrischer Fokusierung untersucht, sondern mittels ELISA, Western Blot, Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation.

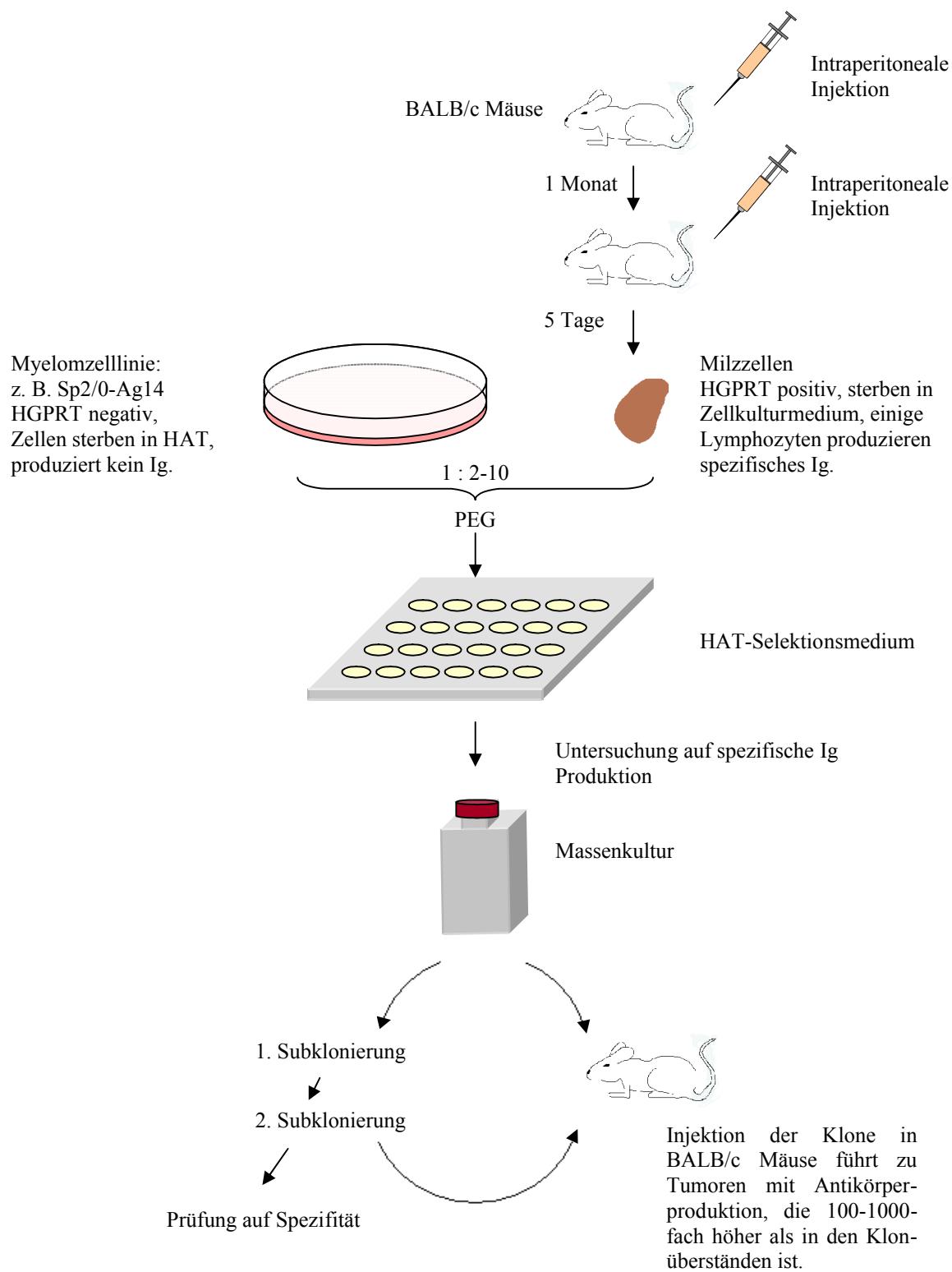


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridom-Technik von Georges J. F. Köhler und César Milstein (modifiziert nach Köhler 1984: *Derivation and diversification of monoclonal antibodies*, Nobel lecture). HGPRT = Hypoxanthinphosphoribosyltransferase, ein Enzym, das notwendig ist, wenn der normale Weg der DNA-Synthese durch Aminopterin blockiert wird. HAT-Selektionsmedium, ein Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. PEG = Polyethylenglykol.

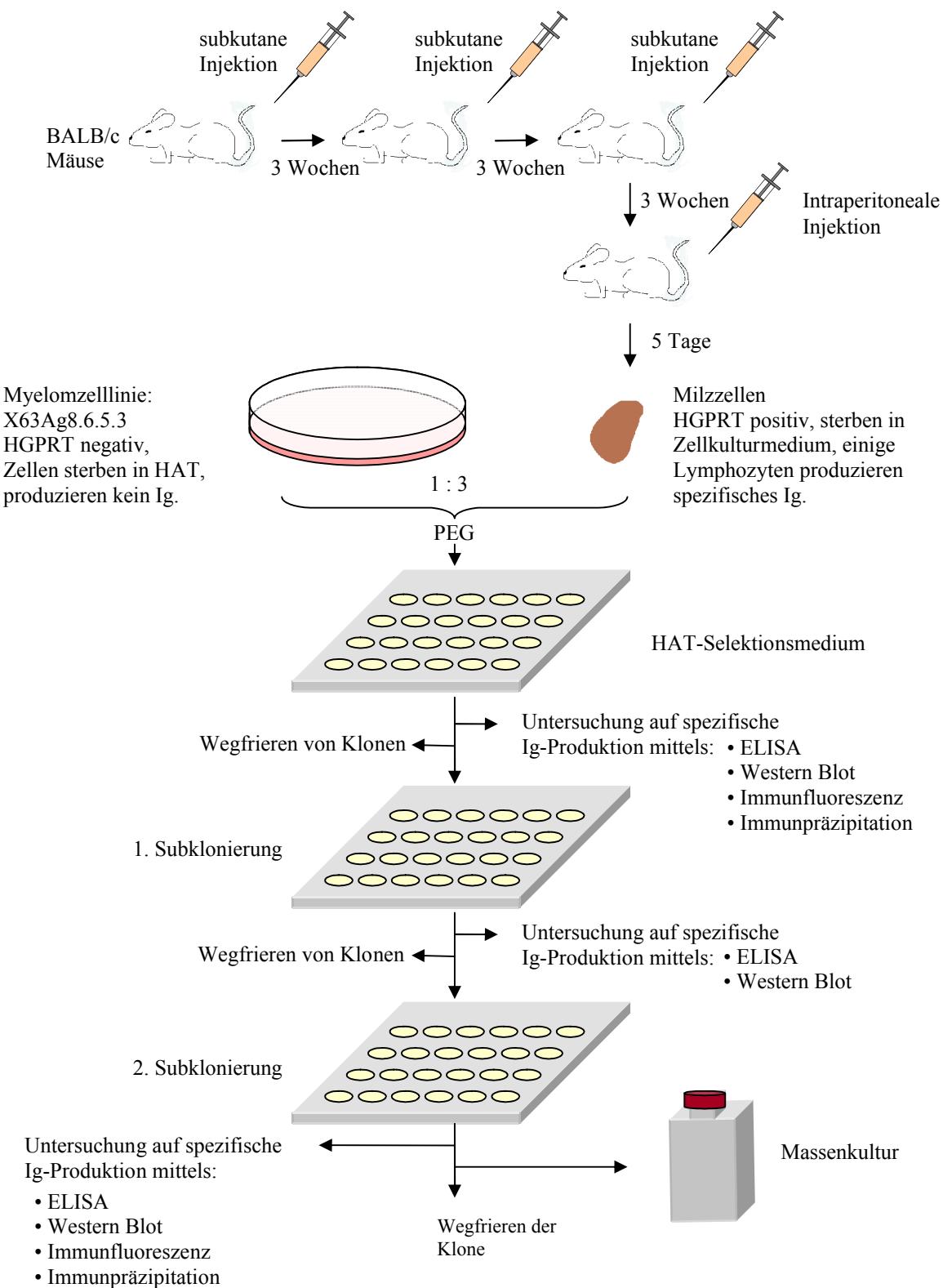


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das menschliche Polycystin-2 Protein. HGPRT = Hypoxanthinphosphoribosyltransferase, ein Enzym, das notwendig ist, wenn der normale Weg der DNA-Synthese durch Aminopterin blockiert wird. HAT-Selektionsmedium, ein Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. PEG = Polyethylenglykol.

1.5 Antikörper gegen Polycystin-2

1.5.1 anti N-terM

Der polyklonale Kaninchenantikörper anti N-terM wurde von G. Aguiari et al. 2004 publiziert. Zur Gewinnung des Antikörpers wurde mittels PCR ein Fragment amplifiziert, das für die Aminosäuren 98 bis 207 von humanem Polycystin-2 kodiert. Das PCR Fragment wurde in den Vektor pGEX-2TK kloniert. Das rekombinante Protein wurde in Bakterien produziert, mittels Glutathionsäule aufgereinigt und anschließend zur Immunisierung von New Zealand White Rabbits verwendet. Der von den Kaninchen gewonnene polyklonale Antikörper anti N-terM wurde mittels Affinitätsaufréinigung gewonnen. Eventuelle anti-GST Antikörper wurden durch eine spezifische Glutathionsäule entfernt. Das polyklonale Antiserum anti N-terM wurde von G. Aguiari et al. erfolgreich im Western Blot getestet. Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und Immunpräzipitation sowie ELISA erfolgten nicht [Aguiari 2004].

1.5.2 anti-PC2 (96525)

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper anti-PC2 (96525) wurde 2003 von Y. Luo et al. publiziert. Zur Herstellung des Antikörpers wurden zunächst Kaninchen mit dem Peptid NH₂-EQRGLEIEMERIRQAAARD-COOH, das die N-terminale intrazelluläre Domäne von Polycystin-2 enthält (Aminosäuren 44 bis 62 in der Maus, die den Aminosäuren 48 bis 66 im Menschen entsprechen), immunisiert. Das Antiserum wurde mittels des zur Immunisierung verwendeten Peptids über Bindung an eine Säule aufgereinigt. Das polyklonale Kaninchen-Antiserum 96525 wurde von Y. Luo et al. erfolgreich in der Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation sowie im Western Blot verwendet. Ein ELISA sowie eine Immunhistochemie erfolgte nicht [Luo 2003].

1.5.3 anti-Zebrafisch Polycystin-2

Im Jahr 2006 wurde von T. Obara et al. der Kaninchen-Antikörper anti-Zebrafisch Polycystin-2 publiziert. Zur Herstellung des Antikörpers wurden zunächst Kaninchen mit dem Peptid NH₂-EKMHEEVGLGPDEC-COOH, das an KLH gekoppelt war und den N-terminalen zytoplasmatischen Anteils des Polycystin-2 Proteins aus Zebrafischen enthielt, immunisiert. Das Antiserum wurde anschließend mittels des zur Immunisierung verwendeten Proteins aufgereinigt. Das aufgereinigte Kaninchen-Antiserum wurde von T. Obara et al. erfolgreich in der Immunhistochemie und im Western Blot verwendet. Eine Testung mittels Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation sowie mittels ELISA erfolgte nicht [Obara 2006].

1.5.4 Mu 12

Institutsinterner polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der gegen das Peptid (AS 349-361) des humanen Polycystin-2 Proteins gerichtet ist. Das Peptid liegt in der ersten Schleifenregion des Proteins. Der Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:2.000 im Western Blot verwendet.

1.5.5 Mu 50

Institutsinterner polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der gegen das Peptid (AS 331-343) des humanen Polycystin-2 Proteins gerichtet ist. Das Peptid liegt in der ersten Schleifenregion des Proteins. Der Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:100 in der Immunfluoreszenz verwendet.

1.5.6 p30

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper p30 wurde von A. C. M. Ong et al. 1999 erstmalig publiziert. Zur Gewinnung des Antikörpers wurde ein Fragment der PKD2 cDNA in den Vektor pET32a+ kloniert. Dieses Plasmid wurde in den *Escherichia coli* Stamm AD494DE3 (pLysS) gebracht, um ein Protein, das die C-terminalen 258 Aminosäuren von Polycystin-2 enthielt, zu synthetisieren und anschließend mittels Ni²⁺-Säule aufzureinigen. Das polyklonale Antiserum p30 wurde von A. C. M. Ong et al. im Western Blot, in der Immunfluoreszenz sowie Immunhistochemie erfolgreich getestet. Eine Testung bezüglich der Funktionsfähigkeit von p30 in der Immunpräzipitation sowie im ELISA erfolgte nicht [Ong 1999].

1.5.7 PKD2-CP

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper PKD2-CP wurde von L. Foggensteiner et. al. erstmalig im Jahr 2000 publiziert. Zur Gewinnung des Antikörpers wurde zunächst das Peptid NH₂-CEGMEGAGGNGSSNVH-COOH, das den Aminosäuren 953 bis 968 von humanem Polycystin-2 entspricht, synthetisiert und an keyhole limpet hemocyanin gebunden. Hiermit erfolgte die Immunisierung von New Zealand White Rabbits. Das polyklonale Antiserum wurde durch das zur Immunisierung verwendete Peptid, das an NHS-Sepharose 4 Fast Flow gebunden war, aufgereinigt. Die von L. Foggensteiner et al. durchgeführte Testung des Antikörpers zeigte positive Resultate in der Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und Immunpräzipitation sowie negative Resultate bei der Testung im Western Blot. Ein ELISA wurde nicht durchgeführt [Foggensteiner 2000].

1.5.8 PKD2-CFP

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper PKD2-CFP wurde von L. Foggensteiner et. al. erstmalig 2000 publiziert. Das für die C-terminale zytoplasmatische Region von Polycystin-2 kodierende Fragment der PKD2 cDNA wurde in pGEX-4T kloniert. Mit dem aufgereinigten Protein erfolgte die Immunisierung von New Zealand White Rabbits. Das polyklonale Antiserum wurde gegen GST prä-absorbiert, um eventuelle anti-GST Antikörper zu entfernen, sowie mit dem zur Immunisierung verwendeten Protein affinitätsgereinigt. Die von L. Foggensteiner et. al. durchgeführte Testung des Antikörpers zeigte positive Resultate in der Immunfluoreszenz und im Western Blot sowie negative Resultate bei der Testung in der Immunhistochemie. Eine Immunpräzipitation sowie ein ELISA wurden nicht durchgeführt [Foggensteiner 2000].

1.5.9 PKD2-NP

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper PKD2-NP wurde von L. Foggensteiner et. al. erstmalig im Jahr 2000 publiziert. Zur Gewinnung des Antikörpers wurde zunächst das Peptid NH₂-MVNSSRVQPQQPDC-COOH, das den Aminosäuren 1 bis 12 von Polycystin-2 entspricht, synthetisiert und an keyhole limpet hemocyanin gebunden. Hiermit erfolgte die Immunisierung von New Zealand White Rabbits. Das polyklonale Antiserum wurde durch das zur Immunisierung verwendete Peptid, das an NHS-Sepharose 4 Fast Flow gebunden war, aufgereinigt. Die von L. Foggensteiner et. al. durchgeführte Testung des Antikörpers zeigte positive Resultate in der Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und Immunpräzipitation sowie negative Resultate bei der Testung im Western Blot. Ein ELISA wurde nicht durchgeführt [Foggensteiner 2000].

1.5.10 YCC2

Im Jahre 1999 publizierte Y. Cai et al. erstmalig den polyklonalen Kaninchen-Antikörper YCC2. Ein durch PCR erzeugtes Fragment wurde in den Expressionsvektor pGEX2T subkloniert. Das Fusionsprotein C2 (Aminosäuren 687-962), das den größten Teil des zytoplasmatischen C-terminalen Endes von humanem Polycystin-2 enthielt, wurde in Bakterien produziert und anschließend mittels Glutathion-Agarose aufgereinigt. Dieses aufgereinigte Protein wurde zur Immunisierung von New Zealand White Rabbits verwendet. Das polyklonale Kaninchen-Antiserum YCC2 wurde von Y. Cai et al. in der Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation, ELISA und Western Blot erfolgreich getestet. Zusätzlich wurde YCC2 aufgereinigt. Dies geschah, indem zunächst das GST-C2 Fusionsprotein durch Thrombin gespalten wurde und das GST Protein durch Bindung an Glutathion-Agarose entfernt wurde. Dieses aufgereinigte C2-Protein wurde an Hi-Trap Säulen gebunden und das polyklonale Antiserum YCC2 dadurch aufgereinigt und der aufgereinigte Antikörper YCC2-P erhalten. Dieser wurde erfolgreich in der Immunhistochemie verwendet [Cai 1999].

1.5.11 YCB9

1999 publizierte Y. Cai et al. erstmalig den polyklonalen Kaninchen-Antikörper YCB9. Das durch PCR erzeugte Fragment wurde in den Expressionsvektor pGEX2T subkloniert. Das Fusionsprotein B9 (Aminosäuren 103-203), das das zytoplasmatische N-terminale Ende von humanem Polycystin-2 enthielt, wurde in Bakterien produziert und anschließend mittels Glutathion-Agarose aufgereinigt. Dieses aufgereinigte Protein wurde zur Immunisierung von New Zealand White Rabbits verwendet. Das polyklonale Kaninchen-Antiserum YCB9 wurde von Y. Cai et al. in der Immunfluoreszenz, Immunhistochemie, Immunpräzipitation sowie im ELISA und Immunoblot erfolgreich getestet [Cai 1999].

1.5.12 1A11

Der Antikörper wurde erstmalig von Q. Lie et al. 2003 publiziert. Hierzu wurde ein cDNA-Fragment, das für das C-terminale Ende von humanem Polycystin-2 kodiert, in die *Bam*H I-Stelle des Vektors pGEX-SX-3 hineinkloniert. Das GST-Fusionsprotein wurde im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert, aufgereinigt und zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Das

monoklonale Mäuse-Antiserum 1A11 wurde von Q. Li et al. erfolgreich in der Immunpräzipitation getestet. Weitere Testungen mittels Western Blot, ELISA und Immunfluoreszenz erfolgten nicht [Li 2003].

1.5.13 Zusammenfassung der Antikörper

Seit dem Jahr 1999 sind eine Vielzahl von gegen tierisches bzw. menschliches Polycystin-2 gerichtete polyklonale Antikörper entwickelt worden. Die nachfolgende Tabelle soll einen Überblick über die derzeit gebräuchlichsten Antikörper geben.

Antikörper	Spezies / Typ	Immunzytochemie	Immunhistochemie	Immunpräzipitation	ELISA	Western Blot	Forschergruppe
anti-N-terM	Kaninchen polyklonal	nicht erfolgt	nicht erfolgt	nicht erfolgt	nicht erfolgt	+	Aguiari 2004
anti-PC2 (96525)	Kaninchen polyklonal	+	nicht erfolgt	+	nicht erfolgt	+	Luo 2003
anti-zebrafish PC2	Kaninchen polyklonal	nicht erfolgt	+	nicht erfolgt	nicht erfolgt	+	Obara 2006
Mu 12	Kaninchen polyklonal	nicht erfolgt	+	nicht erfolgt	nicht erfolgt	nicht erfolgt	Institutsintern
Mu 50	Kaninchen polyklonal	+	nicht erfolgt	nicht erfolgt	nicht erfolgt	nicht erfolgt	Institutsintern
p30	Kaninchen polyklonal	+	+	nicht erfolgt	nicht erfolgt	+	Ong 1999
PKD2-CP	Kaninchen polyklonal	+	+	+	nicht erfolgt	-	Foggensteiner 2000
PKD2-CFP	Kaninchen polyklonal	+	-	nicht erfolgt	nicht erfolgt	+	Foggensteiner 2000
PKD2-NP	Kaninchen polyklonal	+	+	+	nicht erfolgt	-	Foggensteiner 2000
YCC2	Kaninchen polyklonal	+	gereinigt +	+	+	+	Cai 1999
YCB9	Kaninchen polyklonal	+	+	+	+	+	Cai 1999
1A11	Maus monoklonal	nicht erfolgt	nicht erfolgt	+	nicht erfolgt	nicht erfolgt	Li 2003

Tab. 1.1: Die gebräuchlichsten Antikörper gegen Polycystin-2. Dabei bedeuten: „+“ = erfolgreich getestet, „-“ = nicht erfolgreich getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Medien, Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien, Medien und Reagenzien sind in Tabelle 2.1 mit Angabe der Bezugsquelle zusammengestellt.

Chemikalien	Hersteller/Vertrieb
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Bisbenzimid (Hoechst 33258)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Coomassie Brilliant Blau G 250	Sigma-Aldrich, München
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
DePeX	Serva, Heidelberg
Doxozyklin	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Eiweissglycerin	Chroma, Münster
Eosin G	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylenediamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Etoposid	Sigma-Aldrich, München
Eukobrom-Entwickler	Tetenal, Norderstedt
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduzierte Form	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Histosec (Paraffin)	Merck, Darmstadt
Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (50x) (HAT)	Sigma-Aldrich, München
Imidazol	Merck, Darmstadt
Immersol™ 518 F: Immersionsöl zum Mikroskopieren	Carl-Zeiss, Jena
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot

Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
Ketamin	WDT, Garbsen
Sucofin Magermilchpulver	TSI, Zeven
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-7-hydrat	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, München
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Oxalacetat, Pyruvat, Insulin (OPI)	Sigma-Aldrich, München
Oxazolon (4-Ethoxymethylen-2-phenyl-2-oxazolin-5-on)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
o-Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, München
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
Protein G Plus-Agarose Suspension	Merck, Darmstadt
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Biosciences, Freiburg
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, München
Rinder-Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Thimerosal	Sigma-Aldrich, München
Titermax Classic Adjuvans	Sigma-Aldrich, München
Toluidinblau	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypan Blau	Biochrom, Berlin

Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Tween 20	Serva, Heidelberg
Xylol	Merck, Darmstadt

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Medien und Reagenzien.

2.1.2 Kits

Die verwendeten Kits sind in Tabelle 2.2 mit Angabe der Bezugsquelle zusammengestellt.

Kits	Hersteller/Vertrieb
Western Lightning Chemoluminescence Reagent	Perkin Elmer, Rodgau
Wizard Plus Midiprep DNA Purification System	Promega, Mannheim
Glutathion-Agarose	Sigma-Aldrich, München

Tab. 2.2: Verwendete Kits.

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Die Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.3 mit Angabe der Bezugsquelle aufgelistet.

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Vertrieb
Alu-Folie	Melitta, Berlin
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices: 15 ml; 5 MWCO; Regenerierte Zellulose	Millipore, Schwalbach
Chromatographie-Papier "3MM Chr"	Whatman, Dassel
Chromatographie-Säulen (Gravitations-Säulen aus Kunststoff)	VWR International, Darmstadt
Deckgläschchen aus Glas: 12 mm Durchmesser (rund)	Langenbrinck, Teningen
Deckgläschchen aus Glas 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe
Dialyseschlauch 12.000-14.000 MWCO glycerolhaltig; regenerierte Zellulose	Medicell International, London, UK
Klammern für Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Cup-Ständer	Roth, Karlsruhe
Einfrierröhrchen (Nalgene)	Nunc, Wiesbaden
Film-Kassetten: Universal 100 (35,6 x 43,2 cm) mit Verstärkerfolie (für Röntgenfilme bei der Entwicklung von Western Blots)	Rego X-Ray, Augsburg
Glas-/Kunststoffgeräte: Flaschen, Kulturkolben etc.	Roth, Karlsruhe
Gewebekulturplatten (24-Loch)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Handschuhe (Latex)	Kimberly-Clark, Koblenz
Handschuhe (Nitril)	Roth, Karlsruhe
Haushaltstücher	Fripa, Miltenberg
Hämatokrit-Kapillaren (heparinisiert)	Brand, Wertheim
Kanülen: 21 G x ½	Braun Melsungen, Melsungen
Klarsichtfolien (transparent)	Leitz/Durable, Stuttgart

Kosmetiktücher	Kimberly-Clark, Koblenz
Kryoboxen und Metallständer	Fisher Scientific, Schwerte
Kryovials	Nunc, Wiesbaden
Küvetten Typ 100 (Kunststoff) für Spektralphotometer U-2000; 1 ml (Proteinbestimmung und OD-Messungen)	Sarstedt, Nümbrecht
Microspin S-200 HR Säule	Amersham Biosciences, Freiburg
MF-Millipore Membranfilter: 0,025 µm zur Sterilfiltration	Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatten (96-Loch)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
NY-Plus-Membran	Macherey-Nagel, Düren
Objektträger (Glas: 76 x 26 mm)	Langenbrinck, Teningen
Pappkartonschachteln für Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	American National Can / Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Pinzetten	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran: 0,45 µm Porengröße Immobilon-P-Transfer Membran	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße (Kunststoff): 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (Polyallomer): 1,5 ml; Microfuge® Tube	Beckman Coulter, Krefeld
Röntgenfilme (Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF 18 x 24 cm und 35 x 43 cm)	Fuji Photo Film, Düsseldorf
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	Braun Melsungen, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Timer	Roth, Karlsruhe
VIVASPIN 2: 2 ml; PES; 5 MWCO: Proteinkonzentratoren für Zentrifugen	VIVASCIENCE, Hannover
Zellkulturbedarf: 25 und 75 cm ² -Filterflaschen, 3 cm-, 6 cm- und 10 cm-Petrischalen, 6-, 24- und 96-Loch-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenbecher (Kunststoff) mit Schraubverschluss (250 ml)	Beckman, München
Zentrifugenröhrchen: 50 ml und 15 ml aus Kunststoff	Sarstedt, Nümbrecht

Tab. 2.3: Zusammenstellung der Verbrauchsmaterialien.

2.1.4 Geräte und Instrumente

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzten Geräte und Instrumente sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Geräte und Instrumente	Hersteller/Vertrieb
Autoklav: Systec 5050 ELV	Systec, Wettenberg
Autoklav: Vacuklav® 30-B	Melag Medizintechnik, Berlin
Agarose-Gelelektrophorese Dokumentationssystem „Gel Max“	Intas, Göttingen
Agarose-Gelelektrophorese Midisystem „Easy Cast“	Owl Scientific, Rochester, NY, USA
Agarose-Gelelektrophorese Minisystem „Horizon 58“	Invitrogen, Karlsruhe
CMV-E: Eppendorf-Cup-Rotator („über Kopf“)	Fröbel Labortechnik, Lindau
Wasserummantelter CO ₂ -Inkubator	NuAire, Plymouth, MN, USA
Digitalkamera DMC2 (für Fluoreszenzmikroskop Axioskop)	Polaroid Deutschland, Dreieich
Eismaschine AF 10	Scotsman, Vernon Hills, IL, USA
Electroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Lesegerät „Sunrise remote control“	TECAN, Crailsheim
Feinwaage „Mettler H10w“	Mettler Toledo, Giessen
Flüssigstickstofftank: ARPEGE TP 100 (zum Lagern von Zellen)	Air Liquide, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop „Axioskop“	Carl Zeiss, Jena
Gefrierschränke Privileg bis -20°C	Quelle, Fürth
Heizplatten mit Magnetrührer „MR 3001“	Heidolph, Kelheim
Inkubationsschrank „Kelvitrон t“	Kendro Heraeus, Langenselbold
Inkubationsschüttler „Unitron“	Infors, Bottmingen, CH
Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Jena
Kühlschränke Privileg	Quelle, Fürth
Kühlzentrifuge „Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454	Kendro Heraeus, Langenselbold
Kühlzentrifuge „Sigma 3K20“ mit Rotor Nr. 12154 oder 12158	Braun, Melsungen
Längenmessgerät „Caliper“	Kroepelin, Schlüchtern
Microplate Reader	Bio-Rad, München
Mikroskop „Nikon Eclipse TS 100“	Nikon Deutschland, Düsseldorf
Mikrowelle Privileg 8018E	Quelle, Fürth
Neubauer Zählkammer mit Deckglas: 0,1 mm Tiefe / 0,0025 mm ²	Brand, Wertheim
pH-Meter „766 Calimatic“	Knick, Berlin
Scanner DUOSCAN f40	Agfa, Köln
Schüttler für SDS-Gele und Western Blot Membranen (Kippbewegung)	Oehmen Labortechnik, Essen
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System „SE 600 Series Electrophoresis Unit“ (140 x 120 x 1,5 mm)	Hoefer, Holliston, MA, USA

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System 9 (80 x 40 x 0,75 oder 1,0 mm): Mini Protean® II Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München
Spektrophotometer „U2000“	Hitachi High-Technologies, Krefeld
Thermomixer 5436: Eppendorf-Cup-Rüttler (Kreisbewegung)	Eppendorf, Hamburg
Thermostat „Polystat cc1“	Huber, Reinach, CH
Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329	Kendro Heraeus, Langenselbold
Ultraschallgerät „Vibra Cell“	Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA
Ultrazentrifuge: Optima® MAX-E mit Rotor TLA-55; 100.000 rpm	Beckman Coulter, Krefeld
Vortexer „Vortex-Genie 2“	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Waage „BL 1500S“	Sartorius, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage „Seralpur PRO 90 CN“	Seral, München
Western-Transferkammer „TE 62“ (Tank-Blotting)	Hoefer, Holliston, MA, USA
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, München
Zellkulturarbeitsbank: Heraeus Lamin Air HA 2448 GS	Kendro Heraeus, Langenselbold
Zellkulturarbeitsbank: HERA safe	Kendro Heraeus, Langenselbold
Zellkultur-Brutschrank APT.line® CB	Binder, Tuttlingen
Quarzküvetten QS 1.000 schwarz; 100 µl Schichtdicke und Zentrum jeweils 10 mm für Spekralphotometer „U-2000“ (für DNA- und Proteinbestimmung)	Hellma, Müllheim

Tab. 2.4: Übersicht der benutzten Geräte und Instrumente.

2.1.5 Software

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzte Software ist in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Software	Beschreibung
Adobe Photoshop	Programm zur digitalen Bildbearbeitung
File Maker Pro 6	Institutseigene Datenbanken
Microsoft Excel	Tabellenkalkulations-Programm
Microsoft Word	Textverarbeitungs-Programm
Microsoft Powerpoint	Präsentations-Programm
Image Pro Express	Bildaufnahme-Programm für Fluoreszenzmikroskop Axioskop 200 m mit DMC 2-Kamera

Tab. 2.5: Übersicht der benutzten Software.

2.1.6 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in der nachstehenden Tabelle 2.6 aufgeführt.

Enzym	Konz.	Typ	Quelle
Hind III	10 U/ μ l	Restriktionsendonuklease	Fermentas

Tab. 2.6: Übersicht der verwendeten Enzyme.

2.1.7 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Plasmide	Größe in kBp	Selektion	Beschreibung (Sequenzangaben in 5'-,3'-Richtung der kodierenden Sequenz)	Quelle
pET28a	5,4	Kan	Der pET28a Vektor enthält den T7-Promoter und kodiert für einen N-terminalen 6-fachen Histidin-Schwanz, eine Thrombin-Schnittstelle, einen T7-Tag und einen C-terminalen 6-fachen Histidin-Schwanz. Da mit Ausnahme zwischen N-terminalen Histidin-Schwanz und der Thrombinschnittstelle zwischen jedem der genannten Sequenzelemente Restriktions-schnittstellen liegen, kann die Ziel-DNA je nach gewünschter Tag-Kombination einkloniert werden.	Novagen
pET21b	5,4	Amp	Der pET21b Vektor enthält den T7-Promotor und kodiert für einen N-terminalen T7-Tag und einen C-terminalen 6-fachen Histidin-Schwanz. Die Ziel-DNA kann je nach gewünschter Tag-Kombination einkloniert werden, da zwischen jedem genannten Sequenzelement Restriktions-Schnittstellen liegen.	Novagen
pET28aΔT7/PKD2C	6,3	Kan	Kodiert für den C-terminalen Bereich von humanem Polycystin-2 (Bp-Bereich 2104-2973) gebunden an einen 6-fachen Histidin-Schwanz.	Instituts-intern
pET21b/CIP1 (116/493)	5,8	Amp	Kodiert für humanes PIGEA14, gebunden an einen 6-fachen	Instituts-intern

			Histidin-Schwanz.	
pcDNA3	5,4	Amp	Enthält ein Neomycin Resistenzgen sowie den CMV-Promotor.	Invitrogen
pcDNA3/CD8	7,2	Amp	Plasmid mit cDNA-Sequenz für das humane T-Zell-Oberflächen-Glykoprotein CD8.	N. Maltby
pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973)	7,0	Amp	Plasmid mit cDNA Sequenz für humanes Polycystin-2 im Bereich des C-terminalen Endes (Nukleotide 2104-2973) sowie für das humane T-Zell-Oberflächen-Glykoprotein CD8.	Institut-intern
pBluescript II (-)	3,0	Amp	Der Vektor pBluescript II (-) ist ein Klonierungsplasmid, das den T7- und T3-Promotor enthält und multiple Restriktions-Schnittstellen aufweist.	Stratagene
pGEX-4T-1/PKD2C	7,9	Amp	Plasmid mit cDNA-Sequenz für humanes Polycystin-2 (Nukleotide 2104-2973)	S. Somlo

Tab. 2.7: Übersicht der verwendeten Plasmide.

2.1.8 Primärantikörper

In Tabelle 2.8 sind die verwendeten Primärantikörper aufgelistet.

Antikörper	Immunogen/Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle/ Referenz
F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3	C-terminaler Bereich von humanem Polycystin-2	Maus, monoklonal	1:300 (WB) 1:1.000 (IC)	Hybridom-Zelllinie, Ergebnis dieser Arbeit
F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4	C-terminaler Bereich von humanem Polycystin-2	Maus, monoklonal	1:1.000 (WB) 1:300 (IC)	Hybridom-Zelllinie, Ergebnis dieser Arbeit
OKT8	Gegen CD8-Antigen gerichtet	Maus, monoklonal	1:30 (IC)	Hybridom-Zelllinie von W. Nickel, BZH Heidelberg
YCC2	Gegen Aminosäuren 687-962 von Polycystin-2 gerichtet	Kaninchen, polyklonal	1:4.000 (WB)	S. Somlo, Yale University, New Haven
12CA5	Gegen das Peptid NH ₂ -YPDVPDYA-COOH aus dem Hämaggglutinin-Protein (HA) des Influenza-Virus A gerichtet	Maus, monoklonal	1:30 (WB)	Hybridom-Zelllinie von J. Kyriakis, Diabetes Center MGH, Boston: Field et al. (1983)

Tab. 2.8: Übersicht der verwendeten Primärantikörper. IC = Immunzytochemie; WB = Western Blot

2.1.9 Sekundärantikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Antikörper	Immunogen/Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle/ Referenz
Cy3-anti-Maus IgG	Gegen die schweren und leichten Ketten von IgG der Maus gerichtet	Ziege, polyklonal	1:300 (IC)	Jackson Immuno Research, Dianova
HRP-anti Kaninchen IgG	Gegen IgG (gesamtes Molekül) aus Kaninchen gerichtet	Ziege, polyklonal	1:20.000 (WB)	Sigma
HRP-anti-Maus IgG	Gegen IgG (gesamtes Molekül) aus der Maus gerichtet	Ziege, polyklonal	1:10.000 (WB)	Sigma

Tab. 2.9: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper. IC = Immunzytochemie; WB = Western Blot

2.1.10 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme enthält die nachstehende Tabelle 2.10.

Name	Selektion	Beschreibung	Quelle
BL21 (DE3)	-	Expressionsstamm mit chromosomaler Kopie der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines <i>lacUV5</i> -Promotors. Hierdurch geeignet zur Expression von Vektoren mit T7-Promotoren (z.B. pET-Vektoren) aber auch von Vektoren mit <i>tac</i> -Promotoren (z.B. pGEX-Vektoren)	Novagen
DH5 α	-	Klonierstamm, aber auch als Expressionsstamm nutzbar für Vektoren mit <i>tac</i> -Promotoren (z.B. pGEX-Vektoren)	Stratagene
Rosetta TM	Chloramphenicol	Expressionsstamm, der ein Derivat von BL21 ist und das pRARE Plasmid enthält. Hierdurch wird die Expression eukaryontischer mRNAs, die in <i>E. coli</i> selten gebrauchte Kodons enthalten (z.B. AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA), erleichtert und somit die Ausbeute der entsprechenden Proteine erhöht.	Novagen

Tab. 2.10: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

2.1.11 Säugerzelllinien

Es wurden die beiden Säugerzelllinien COS-7 und X63Ag8.6.5.3 verwendet (Tabelle 2.11).

Säugerzelllinien	Herkunft / Ursprung
X63Ag8.6.5.3	Myelomzelllinie der Maus, die nicht zur Immunglobulin-Produktion fähig ist und die das Enzym Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase nicht besitzt. Damit in Gegenwart von Aminopterin nicht zur DNA-Synthese fähig.
COS-7	Zelllinie, die aus der Niere der Grünen Meerkatze gewonnen wurde und stabil das sog. T-Antigen produziert.
F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3	Hybridomzelllinien, Ergebnis dieser Arbeit
F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4	Hybridomzelllinien, Ergebnis dieser Arbeit

Tab. 2.11: Übersicht der verwendeten Säugerzelllinien.

2.1.12 Medien, Lösungen, Puffer

DNA-Klonierung:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Alkali-SDS-Lösung	0,2 M NaOH, 1% SDS
GTE-Puffer	50 mM Glucose-Monohydrat, 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0
Kaliumacetat-Lösung	5 M Kaliumacetat mit 5 M Essigsäure auf 4,8 titriert
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g NaCl [Mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren. Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) bzw. Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) wurden erst nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50°C hinzugefügt]
5x Proben-Puffer (DNA-Agarosegel)	0,125% Bromphenolblau, 15% Ficoll 400, 50 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS
50x TAE-Puffer	2 M Tris, 0,1 M EDTA (Mit Essigsäure auf pH 8,0 einstellen)

Tab. 2.12: Übersicht der verwendeten Materialien zur DNA-Klonierung.

Zellkultur:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Kulturmedium für adhärente Zellen	500 ml DMEM-Medium, 10% FCS
Kulturmedium für X63Ag8.6.5.3 Myelomzellen	500 ml RPMI 1640, 10% FCS
HAT-Medium	375 ml RPMI 1640, 100 ml FCS, 10 ml HAT-Stammlösung, 5 ml OPI-Stamm- lösung, 5 ml Penicillin/Streptomycin- Stammlösung, 3 µl β-Mercaptoethanol, Glucose
HAT-Stammlösung (10 ml)	100 µM Hypoxanthin, 0,4 µM Aminopterin, 16 µM Thymidin
HT-Medium	375 ml RPMI 1640, 100 ml FCS, 10 ml HT- Stammlösung, 5 ml OPI-Stammlösung, 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, 3 µl β-Mercaptoethanol, Glucose
HT-Stammlösung (10 ml)	100 µM Hypoxanthin, 16 µM Thymidin
OPI Stammlösung (10 ml)	1 mM Oxaloacetat, 0,45 mM Pyruvat, 0,2 U/ml Insulin
10x PBS	1,4 M NaCl, 100 mM K ₂ HPO ₄ (Mit 100 mM KH ₂ PO ₄ auf pH 7,5 titrieren)
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (100x)	10.000 IE Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin

Tab. 2.13: Übersicht der verwendeten Materialien in der Zellkultur.Immunfluoreszenz:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Bouin-Fixierlösung	75 ml gesättigte Pikrinsäure, 25 ml Formaldehydlösung 37%, 5 ml Eisessig
4% Paraformaldehyd in 1x PBS (pH 7,4)	4 g Paraformaldehyd zunächst in 90 ml H ₂ O mit 4 Tropfen 1 M NaOH unter Rühren und Erhitzen lösen. Dann 10 ml 10x PBS zugeben und abküh- len lassen. Nach Abfiltration mit 1 M HCl auf pH 7,4 einstellen.
Blockierlösung	2% BSA, 1x PBS, 0,1% Triton X-100
Eindeckmittel	40% Glycerin, 1x PBS Vor Gebrauch jeweils mittels Sterilfilter filtrieren.

Tab. 2.14: Übersicht der verwendeten Materialien für die Immunfluoreszenz.

Proteingel und Western Blot:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Coomassie-Lösung	0,25% Coomassie Brillant Blau G 250, 50% Methanol, 10% Essigsäure
Entfärbler	50% Methanol, 10% Essigsäure
4x Lower Tris	1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS
4x Upper Tris	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS
10x PAGE-Laupuffer	0,25 M Tris, 1,9 M Glycin, 1% SDS
Transferpuffer (Tankblot)	50 mM Tris, 384 mM Glycin, 20% Methanol, 0,01% SDS
Transferpuffer (semi-dry)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02% SDS, 20% Methanol
Blocklösung	5% Magermilchpulver, 0,5% Tween 20, 1x PBS
Waschlösung	0,5% Tween 20, 1x PBS
5x SDS-Probenpuffer	625 mM Tris pH 6,7, 50% Glycerin, 12,5% SDS, 12,5% β-Mercaptoethanol, 0,05% Bromphenolblau

Tab. 2.15: Übersicht der verwendeten Materialien für Proteingel und Western Blot.

Proteinaufreinigung mittels Ni²⁺-Säule:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
1x charge-Puffer	50 mM NiSO ₄
1x binding-Puffer	5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 8,0, 0,1% Triton X-100
1x wash-Puffer	60 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 8,0, 0,1% Triton X-100
1x elute-Puffer	1 M Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 8,0, 0,1% Triton X-100
1x strip-Puffer	100 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 8,0

Tab. 2.16: Übersicht der verwendeten Puffer zur Proteinaufreinigung mittels Ni²⁺-Säule.Proteinaufreinigung mittels Glutathion-Säule:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
1x binding-Puffer	50 mM Tris pH 8,0, 150 mM KCl, 1% Triton X-100
1x elute-Puffer	10 mM Glutathion, 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM KCl, 1% Triton X-100

Tab. 2.17: Übersicht der verwendeten Puffer zur Proteinaufreinigung mittels Glutathion-Säule.

Immunpräzipitation:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
1x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris pH 6,7, 2,5% SDS, 10% Glycerol, 2,5% β-Mercaptoethanol, 0,01% BPB
Lysepuffer	1% Triton X-100 in 1x PBS
Waschpuffer	1% Triton X-100 in 1x PBS

Tab. 2.18: Übersicht der verwendeten Materialien für die Immunpräzipitation.ELISA:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Blocklösung	3% BSA in 1x PBS
Entwicklungslosung	6 µl 30% H ₂ O, 360 µl Tetramethylbenzidin (3 mg/ml) gelöst in Aceton, 5,64 ml 0,1 M Zitronensäure, 4,36 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄
Stopplösung	5,3 % H ₂ SO ₄ (entspricht einer 18-fachen Verdünnung von 97-99% H ₂ SO ₄)
Waschlösung	1x PBS pH 7,5

Tab. 2.19: Übersicht der verwendeten Materialien für ELISA.Transfektion von COS-7-Zellen:

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Transfektionslösung	10 mg/ml DEAE-dextran, 2,5 mM Chloroquin, 1x PBS

Tab. 2.20: Übersicht der verwendeten Materialien zur Transfektion von COS-7-Zellen.

2.2 Methoden

2.2.1 Plasmid-DNA-Midipräparation

Am Vorabend der DNA-Aufreinigung wurden 150 ml LB-Medium (mit einer Ampicillin-Konzentration von 500 µg/ml) mit Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Die DNA-Midipräparation wurde unter Anwendung des Wizard-Plus-Midiprep-Kits der Firma Promega durchgeführt.

Die Übernachtkultur wurde 10 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 3 ml Resuspensionspuffer vollständig gelöst. Anschließend wurden 3 ml Lysepuffer hinzugegeben, vorsichtig mit der Probe vermischt, für max. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 3 ml Neutralisierungslösung versehen. Daraufhin wurde die Probe 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgefiltert und mit 10 ml Harz versetzt. Dieses Harz/DNA-Gemisch wurde auf die mitgelieferte Midisäule überführt,

die an ein Vakuum angeschlossen wurde. Nachdem die Flüssigkeit die Säule durchlaufen hatte, wurde noch zweimal mit 15 ml Wasch-Lösung gewaschen und danach die Säule für 20 Sekunden vakuumgetrocknet. Zusätzlich wurde die Midisäule 2 Minuten bei 10.000 rpm und Raumtemperatur mittels Zentrifugieren getrocknet. Daraufhin wurde auf die Säule 300 µl von 65°C warmen H₂O gegeben und für eine Minute inkubiert. Durch Zentrifugieren der Säule für 20 Sekunden bei 10.000 rpm und Raumtemperatur konnte die Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen werden. Durch erneute Zentrifugation konnte das restliche Harz pelletiert werden und man erhielt die gereinigte Plasmid-DNA im Überstand. Anschließend wurde photometrisch die Konzentration der DNA sowie mittels Restriktionsverdau ihre Qualität bestimmt.

2.2.2 Bestimmung der Konzentration von DNA

Die Konzentration von in H₂O gelöster DNA wurde in einem Spektralphotometer bei 260 nm gegen H₂O als Referenz gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 0,05 µg dsDNA/µl.

2.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsendonukleasen wurden gemäß den Angaben der Hersteller in den mitgelieferten Puffern verwendet. Eine bestimmte Menge der jeweiligen Plasmid-DNA wurde mit 1/10 des Endvolumens in 10x Reaktionspuffer mit dem entsprechenden Enzym und H₂O vermischt. Pro 1 µg DNA und pro Restriktionsschnittstelle wurde ca. 1 Einheit (1 U) Enzym eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei einer für das Enzym optimalen Temperatur für 1 ½ Stunden verdaut. Anschließend erfolgte eine Gel-Elektrophorese zur Kontrolle.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Das Prinzip der DNA-Gelelektrophorese besteht darin, die DNA im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Größe aufzutrennen. Die Agarose-Konzentration des Gels wird je nach Größe der aufzutrennenden DNA gewählt. Hierfür wurde die jeweils gewählte Menge an Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und die entsprechende Menge an 1x TAE-Puffer zugegeben. Für die verwendeten Mini-Gele wurden 25 ml des Agarose / 1x TAE-Puffer-Gemisches angesetzt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen des Gemisches auf ca. 50°C wurde die jeweils entsprechende Menge Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben und das Gemisch in eine horizontale Gelkammer mit bereits eingestecktem Kamm gefüllt. War das Gel erstarrt, wurde die Gelkammer so mit 1x TAE-Puffer gefüllt, dass das Gel vollständig damit bedeckt war. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die bereits vorher mit Stopp-Puffer versetzten Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit konstanter Spannung von 150 V durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande etwa die Mitte des Gels erreicht hatte. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Tisch photographiert.

2.2.5 Induktion der Proteinsynthese in Bakterien

Am Vorabend der Induktion wurden ca. 20 ml LB-Medium (mit der optimalen Antibiotika-Konzentration) mit den jeweiligen Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine 500 ml Kultur 1:100 beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von ca. 0,5 bei 550 nm auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Kultur für 15 min auf 30°C abgekühlt und mit 1 mM IPTG induziert. Anschließend ließ man sie bis zur Ernte 4 Stunden bei 30°C wachsen. Bevor die Kultur danach für 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert wurde, wurde 1 ml entnommen und die OD bei 550 nm gegen LB-Medium gemessen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in dem 1x binding-Puffer (2 ml für 100 OD_{550 nm}) resuspendiert. Um das Protein aus den Bakterienzellen freizusetzen, wurde die Suspension zweimal für jeweils 1 Minute einem Ultraschall von 375 W ausgesetzt, bis die Suspension zu schäumen begann. Dabei wurde die Suspension mit Eis gekühlt und die Pause dazwischen betrug 1 Minute. Schließlich wurde die Suspension für 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 50 ml Zentrifugenrörchen überführt und das Pellet verworfen. Zur Lagerung konnte der Überstand bei -80°C weggefroren werden.

2.2.6 Aufreinigung von Protein mittels Ni²⁺-Säule

Da das zur Immunisierung der Mäuse verwendete Protein einen Histidin-Schwanz mit 6 Histidinen besaß, konnte es über eine Ni²⁺-Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml aufgereinigt werden (entsprechend einer Bindekapazität von 10 mg Protein). Hierfür wurde die Säule zunächst mit 5 ml H₂O gewaschen sowie anschließend mit 10 ml 1x charge-Puffer und 1x binding-Puffer vorbereitet. Daraufhin wurde die aufzureinigende Probe hinzugegeben und die Säule mit 15 ml 1x wash-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das aufgereinigte Protein mittels 1x elute-Puffer in 6 Fraktionen zu je 500 µl eluiert, die in eisgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßern aufgefangen wurden. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde photometrisch bestimmt und die Fraktionen bei -80°C aufbewahrt. Die verwendete Ni²⁺-Säule wurde mit 10 ml H₂O gewaschen, mit 5 ml 1x strip-Puffer regeneriert und mit 1x strip-Puffer gefüllt bei 4°C gelagert.

2.2.7 Aufreinigung von Protein mittels Glutathion-Säule

Die Aufreinigung erfolgte über eine Glutathion-Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml und einer Bindekapazität von 5 mg. Hierfür wurde die Säule zunächst mit 3 ml H₂O gewaschen sowie anschließend mit 5 ml 1x binding-Puffer vorbereitet. Daraufhin wurde die aufzureinigende Probe hinzugegeben und das aufgereinigte Protein mittels 1x elute-Puffer in 6 Fraktionen zu je 500 µl eluiert, die in eisgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßern aufgefangen wurden. Die Fraktionen des aufgereinigten Proteins wurden bei -80°C aufbewahrt und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Die verwendete Glutathion-Säule wurde mit 3 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml 1x PBS / 3 M NaCl sowie mit 3 ml 20% Ethanol regeneriert. Die Lagerung erfolgte mit 20% Ethanol gefüllt bei 4°C.

2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 10 µl der unverdünnten, bzw. der verdünnten Proben mit 1 ml Coomassie-Lösung in einer Küvette gemischt und die Absorption zügig bei 450 und 590 nm in einem mit H₂O kalibrierten Spektralphotometer gemessen. Zudem wurde eine Nullprobe (10 µl Wasser in 1 ml Coomassie-Lösung) gemessen und eine Eichkurve mit 1 ml Coomassie-Lösung und 10 µl BSA in Standardkonzentrationen von 0,1, 0,25, 0,5, 1,5 und 5 µg BSA/µl erstellt.

Mit Hilfe der Eichkurve und den Messwerten der Proben wurden anschließend die Konzentrationen der Proteinlösungen folgendermaßen berechnet: Von allen Proben wurde der Quotient der Absorption bei 450 und 590 nm berechnet und davon jeweils der Quotient der Wasserprobe abgezogen. Hieraus ergab sich für jede Probe ein korrigierter Quotient. Die in den BSA-Standards enthaltenen Mengen an Proteinen wurden jeweils durch ihren korrigierten Quotienten geteilt. Der Mittelwert der dadurch erhaltenen Standardwerte diente als Umrechnungsfaktor, mit dem die jeweiligen korrigierten Quotienten der Proben multipliziert und somit die Proteinkonzentrationen berechnet wurden.

2.2.9 Dialyse von aufgereinigten Proteinen

Zu Beginn wurde das zu dialysierende Protein gelöst im jeweiligen Ausgangspuffer in den Dialyseschlauch pipettiert, der beidseits mit Klemmen verschlossen wurde. Anschließend wurde der Dialyseschlauch mit Hilfe einer kleinen Styroporplatte in eine schwimmende Position gebracht und in einem mit 500 ml des gewünschten Puffers gefüllten Erlenmeyerkolben unter langsamem Rühren bei 4°C dialysiert. Nach zwei Stunden erfolgte der erste Pufferwechsel und nach weiteren zwei Stunden der zweite Pufferwechsel, der über Nacht beibehalten wurde. Am Folgetag konnte das nun in dem gewünschten neuen Puffer befindliche Protein bei -80°C gelagert werden.

2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde ein Gelsystem bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel (4%) verwendet. Zuerst wurde das Trenngel gegossen, wobei die Menge an eingesetzten 30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid von der gewünschten Konzentration des Trenngels abhängig war. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das Gel mit 3 ml H₂O bedeckt. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgenommen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Abhängig von der Anzahl sowie Menge der aufzutragenden Proben wurde das Sammelgel mit einem entsprechenden Gelkamm versehen. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer überführt. Daraufhin wurden die mit entsprechendem Volumen an 2x SDS-Probenpuffer versetzten und 5 Minuten gekochten Proteinproben in die Geltaschen geladen. Durch das Erhitzen wurden die Proteine denaturiert und durch das Detergenz SDS solubilisiert, gleichzeitig erhielten sie eine negative Gesamtladung. Die elektrophoretische Beweglichkeit hing dann einzig von ihrer Größe ab. Unter Kühlung auf 10°C wanderten die Proteine zunächst gemeinsam im Sammelgel zur Anode. Anschließend wurden die Proteine im Trenngel bei gleicher Spannung aufgetrennt, bis das Bromphenolblau am unteren Ende angelangt war.

2.2.11 Coomassie Brilliant Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Diese Färbetechnik diente dem qualitativen Nachweis von Proteinen. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau bindet unspezifisch an Proteine und färbt somit präferentiell Proteine und weniger die Gelmatrix, weshalb durch intensives Entfärben nur die Proteine im Gel als blaue Banden sichtbar bleiben. Zur Färbung der SDS-Polyacrylamidgele wurden diese in einer Schale mit Coomassie Lösung auf einem Schüttler gefärbt. Hierbei wurden zur Färbung eines Gels der Größe 14 cm x 12 cm x 1,5 mm ca. 50 Minuten und zur Färbung eines Gels der Größe 8 cm x 4 cm x 0,75 mm bzw. 1 mm ca. 15 Minuten gebraucht. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung gegeben und mittels mehrmaligen Wechsels der Entfärbelösung entfärbt und schließlich eingescannt.

2.2.12 Tiere und Tierhaltung

Bei den Mäusen handelte es sich um weibliche BALB/c-Mäuse, die im 12 h/12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten wurden. Das handelsübliche Futter für Mäuse und Wasser wurde ad libitum verabreicht.

2.2.13 Immunisierung der Mäuse

Die 6-8 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils 3 Wochen mit 100 µg Protein in 50 µl 1x PBS gemischt mit 125 µl Titermax Classic Adjuvans (Produktnummer: H4397, Sigma-Aldrich, München) immunisiert. Danach erfolgte ebenfalls im Abstand von drei Wochen die vierte Immunisierung mit 100 µg Protein in 100 µl 1x PBS intraperitoneal ohne Adjuvans. Fünf Tage nach dem letzten Boost wurde die Maus getötet und die Milz entfernt (siehe 2.2.18).

2.2.14 Blutentnahme und Serumgewinnung bei Mäusen

Die Blutentnahme wurde am sechsten Tag nach dem zweiten Boost durchgeführt, um einen möglichst hohen Antikörpertiter zu gewährleisten. Dazu wurden den Mäusen die Schwanzvene eröffnet, das Blut mit Hilfe von heparinisierten Hämatokrit-Kapillaren aufgefangen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Blut für eine Stunde bei 37°C und danach über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Blut wurde 10 Minuten bei 3.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Serum abgenommen. Waren nach diesem Schritt noch Erythrozyten im Serum vorhanden, wurde der Schritt wiederholt. Das Serum konnte bei -20°C gelagert werden.

2.2.15 Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und das jeweilige Kulturmedium sind in Tabelle 2.21 zusammengefasst. Die Kultur erfolgte jeweils in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Alle Arbeiten an den verschiedenen Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Zelllinie	Kulturmedium
X63Ag8.6.5.3	RPMI 1640 / 10% FCS
COS-7	DMEM / 10% FCS
F1-47 S1-3.2-Hybridom und F1-47 S1-3.3-Hybridom	RPMI 1640 / 10% FCS
F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4	RPMI 1640 / 20% FCS
Peritoneale Mausmakrophagen	RPMI 1640 / 10% FCS / 1% Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (Stammlösung: 10.000 IE Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)

Tab. 2.21: Übersicht der verwendeten Zelllinien und des jeweiligen Kulturmedium.

- Passagieren von adhärenten Zellen:

Zum Passagieren der adhärenten Zellen wurde, sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, das Kulturmedium aus der Zellkulturflesche abgesaugt und mit 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst. Durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflesche konnte das Ablösen der Zellen vom Gefäßboden beschleunigt werden. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe einer gewünschten Menge an FCS-haltigem Kulturmedium inhibiert und die restlichen noch anhaftenden Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst und vereinzelt. Für die neue Passage wurde entweder ein Aliquot in der Kulturflesche belassen und diese mit neuem Kulturmedium befüllt, alternativ wurde ein Aliquot in eine neue Kulturflesche oder in eine neue Petrischale gegeben und diese mit Kulturmedium befüllt.

- Passagieren von nicht-adhärenten Zellen:

Da sich die Zellen bereits in Suspension befanden, konnte entweder die Suspension aus Kulturmedium und Zellen bis auf ein kleines Aliquot abgesaugt und die Kulturflesche mit neuem Kulturmedium befüllt werden, oder ein kleines Aliquot wurde in eine neue Kulturflesche überführt und diese mit Kulturmedium befüllt.

- Auftauen und Einfrieren von Zellen:

Zur Anlage der Kultur einer Zelllinie wurden die gewünschten Zellen aus flüssigem Stickstoff ausgelagert und in der Hand aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 12 ml RPMI 1640 / 10% FCS bzw. DMEM / 10% FCS überführt und fünf Minuten mit 750 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit dem jeweils notwendigen Medium resuspendiert und in eine 25 ml Zellkulturflesche überführt, welche daraufhin bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurde.

Zum Wegfrieren wurden die Zellen bei Raumtemperatur fünf Minuten mit 750 rpm zentri-fugiert. Der Überstand wurde je nach Bedarf für weitere Versuche verwendet oder verworfen,

während das Pellet mit Einfriermedium (90% FCS / 10% DMSO) resuspendiert und in 1,5 ml Portionen in Kryoröhrchen pipettiert wurde. Die Konzentration betrug hierbei $1,5\text{-}2 \times 10^6$ Zellen pro ml Einfriermedium. Um die Zellen langsam einzufrieren, wurden die Kryoröhrchen zunächst mindestens zwei Tage in Tiefkühlschränken bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff überführt wurden.

2.2.16 Zählen von Zellen

Wurde die genaue Zellzahl benötigt, beispielsweise bei der Zellfusion, so wurden 10 μl der Zellen (bei adhärenten Zellen die resuspendierten Zellen nach dem Zentrifugationsschritt beim Passagieren) im jeweiligen Kulturmedium in eine Neubauer-Zählkammer überführt und unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse TS 100) folgendermaßen ausgezählt:

Es wurden alle Zellen, die sich in den 4 großen Quadranten befanden (jeder große Quadrant besteht aus 16 kleinen Quadranten), ausgezählt und daraus der Mittelwert berechnet. Der mit dem Faktor 10.000 multiplizierte berechnete Mittelwert entsprach dann der Anzahl der Zellen pro ml Kulturmedium.

2.2.17 Präparation von Peritoneal-Makrophagen

Zur Gewinnung der Makrophagen für zwei 96-Loch-Platten wurde eine BALB/c Maus (weiblich, ca. 5 Monate) verwendet. Diese wurde durch Genickbruch getötet und ca. 30 Sekunden in 70% Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen mit einer sterilen Pinzette und Schere das Fell am Bauch abpräpariert. Um die Makrophagen anzulocken, wurden 4 ml (aus einer 5 ml Spritze) einer 20%-igen filtersterilisierten Saccharose-Lösung (Raumtemperatur) in die Peritonealhöhle injiziert. Die Saccharose-Lösung wurde dort für 30 Sekunden unter leichter Massage des Bauches belassen und danach wieder in die Spritze zurückgezogen. Die so gewonnene Lösung mit den Makrophagen wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und fünf Minuten mit 750 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml von RPMI 1640 / 10% FCS / 1% Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (Stammlösung: 10.000 IE Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) resuspendiert und in Aliquots von je 75 μl auf zwei 96-Loch-Platten verteilt. Diese wurden zwei Tage lang bei 5% CO_2 / 37°C inkubiert, bevor die Hybridom-Zellen hinzugegeben wurden. Diese Zeitspanne diente dazu, die Makrophagen an heften zu lassen und vorhandene Kontaminationen bereits vor Zugabe der Hybridomzellen erkennen zu können.

2.2.18 Durchführung einer Zellfusion

Fünf Tage vor Durchführung der Fusion wurde der Maus der letzte Boost mit dem Antigen verabreicht. Dies geschah intraperitoneal mit 100 μg Antigen ohne Adjuvans.

Die Maus wurde durch Genickbruch getötet, in 70% Ethanol desinfiziert und unter sterilen Bedingungen das Fell am Bauch mit einer sterilen Schere und Pinzette entfernt. Dann wurde mit einer neuen sterilen Schere und Pinzette die Peritonealhöhle geöffnet, die Milz frei präpariert und in eine Petrischale (Durchmesser 10 cm) überführt, die 10 ml vorgewärmtes RPMI enthielt. Dort wurde die Milz vom restlichen Bindegewebe gereinigt. Mit einer

frischen sterilen Schere und Pinzette wurde die Milz in eine weitere Petrischale (Durchmesser 10 cm) mit frischem Medium überführt und darin zerkleinert. Die verbliebenen Gewebestückchen wurden mit dem sterilen Stempel einer 5 ml Spritze durch ein 70 µm Sieb gedrückt. Anschließend wurde das Sieb mit 10 ml Medium gespült, um die restlichen Zellen durch das Sieb zu spülen. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenrörchen überführt, die Petrischale noch zweimal mit 5 ml Medium gewaschen, die Zellsuspensionen des Waschvorgangs wurden ebenfalls in das Zentrifugenrörchen gegeben. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich die größeren Gewebestücke absetzen konnten. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenrörchen überführt und mit Medium auf 50 ml aufgefüllt. Daraufhin wurden die Milzzellen für fünf Minuten bei 1.000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Milzzellen in frischen 50 ml Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei beim letzten Waschvorgang das Pellett nur mit 10 ml Medium resuspendiert wurde. Von der Suspension wurden 0,1 ml entnommen und mit 0,9 ml frischem Medium verdünnt. 0,5 ml dieser Lösung wurden mit 0,5 ml Trypan Blau versetzt und die Zellen in einer Zählkammer ausgezählt. Parallel dazu wurden die für die Fusion benötigten Myelomzellen ebenfalls in ein 50 ml Zentrifugenrörchen überführt und auf die gleiche Weise wie die Lymphozyten gewaschen, verdünnt und ausgezählt.

Die Milzzellen wurden zusammen mit den Myelomzellen in einem Verhältnis von 1:3 in ein Zentrifugenrörchen überführt und gemischt. Danach wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1.000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand komplett abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig durch leichtes Klopfen vom Boden des Zentrifugenrörchens abgelöst. Anschließend wurde 1 ml auf 37°C vorgewärmte 50% PEG-Lösung hinzugegeben und die Zellen 1 Minute lang mit der Pipettenspitze vorsichtig gerührt. Unter kontinuierlichem Rühren wurden noch 1 ml Medium innerhalb 1 Minute und danach nochmals 8 ml Medium innerhalb 2 Minuten hinzugegeben. Dann wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 1.000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und in insgesamt 150 ml HAT-Medium resuspendiert, so dass sie auf zehn 96-Loch-Platten mit 150 µl pro Loch ausplattiert werden und bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert werden konnten.

2.2.19 Durchführung einer Subklonierung

Bei der Begutachtung der fusionierten Zellen auf den 96-Loch-Platten konnten die Zellen oftmals erst nach zwei Tagen erkannt werden. Da die Zellen allerdings einen ca. 24-stündigen Teilungszyklus aufwiesen, lagen somit meistens mindestens zwei Zellen vor. Um allerdings einen monoklonalen Antikörper zu erhalten, musste man sicher sein, dass alle weiteren Zellen nur von einer einzigen Vorläuferzelle abstammen, weswegen eine Subklonierung durchgeführt werden musste. Um die statistische Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, einen monoklonalen Klon zu erhalten, wurde die Subklonierung zweimal hintereinander ausgeführt.

- Subklonierung im HT-Medium

Die Klone wurden bis zu einer Konzentration von 350.000-500.000 Zellen/ml wachsen gelassen und dann bei der ersten Subklonierung mit einer Konzentration von 1 Zelle/Loch in jeweils 100 µl HT-Medium auf eine 96-Loch-Platte ausplattiert. Bei der zweiten Subklonierung wurde eine Konzentration von 0,5 Zellen/Loch verwendet.

Nach der zweiten Subklonierung konnte zunächst auf RPMI 1640 / 20% FCS gewechselt werden, wobei zum Umgewöhnen zunächst noch 50% HT-Medium und anschließend 25% HT-Medium verwendet wurden. Anschließend konnte auf RPMI 1640 / 10% FCS unter Anwendung der gleichen Entwöhnungsschritte gewechselt werden.

- Subklonierung mit Verwendung von Makrophagen

Die Klone wurden bis zu einer Konzentration von 350.000-500.000 Zellen/ml wachsen gelassen und dann bei der ersten Subklonierung mit einer Konzentration von 1 Zelle/Loch in jeweils 125 µl HT-Medium auf die 96-Loch-Platte mit den Makrophagen ausplattiert. Nach erfolgter erster Subklonierung wurden die Klone wiederum in HT-Medium hochgezogen, genauso wie nach der zweiten Subklonierung, die ebenfalls mit Makrophagen stattfand. Danach erfolgte wie bei der Subklonierung mit HT-Medium das Ausschleichen auf das Standardmedium.

2.2.20 Gewinnung des „gebrauchten“ HT-Mediums für den Subklonierungsversuch

Ein Teil des zur Subklonierung verwendeten Klons wurde bei Raumtemperatur mit 750 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Zentrifugenrörchen überführt. Dieser wurde anschließend bei Raumtemperatur mit 40.000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und für den Subklonierungsversuch als „gebrauchtes“ HT-Medium verwendet.

2.2.21 Transfektion von COS-7-Zellen mittels DEAE-Dextran-Technik

Die DEAE-Dextran-Transfektion ist eine Methode zur Transfektion von DNA in eukaryontische Zellen und wurde erstmalig von Mc Cutchan 1968 beschrieben, der NK-Zellen mit SV 40 DNA transfizierte [Mc Cutchan 1968]. Allerdings eignet sich diese Methode lediglich zur transienten, jedoch nicht zur stabilen Transfektion von Zellen. Da DEAE-Dextran auf die Zellen toxisch wirkt, muss je nach verwendeter Zelllinie die Konzentration und die Expositionszeit angepasst werden. Als Polykation erleichtert DEAE-Dextran der zur Transfektion verwendeten negativ geladenen DNA an die Zellmembran zu binden und in die Zelle über Endozytose aufgenommen zu werden.

Am Vortag der Transfektion wurden 1,5 Millionen COS-7-Zellen auf eine Petrischale (Durchmesser 10 cm) in 15 ml DMEM / 10% FCS ausgesät. Kurz vor der Transfektion wurden 5 ml DMEM / 10% FCS mit 200 µl 1x PBS / 10 mg/ml DEAE-Dextran / 2.5 mM Chloroquin gemischt. Zu dieser Mischung wurden 20 µg der entsprechenden DNA hinzugefügt und abermals gemischt. Das Medium der COS-7-Zellen wurde abgesaugt und durch die DNA/DEAE-Dextran-Mischung ersetzt, woraufhin die Zellen weiter bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert wurden.

Nach vier Stunden wurde die Mischung entfernt und die COS-7 Zellen mit 5 ml 10% DMSO (in 1x PBS) für 2 Minuten bei Raumtemperatur geschockt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit frischen 15 ml DMEM / 10% FCS für 48 Stunden inkubiert.

2.2.22 Herstellung von Zelllysaten

Das Kulturmedium wurde von der Petrischale abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml 1x PBS auf die Petrischale gegeben, die Zellen abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dies wurde für 5 Minuten bei 4.000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet je nach Größe in 50 bis 200 µl 1% Triton X-100 (in 1x PBS) resuspendiert und fünf Minuten auf Eis gestellt. Dann wurde die Probe bei 14.000 rpm und 4°C für fünf Minuten abzentrifugiert. Der das Proteinlysat enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und konnte bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.2.23 Gewinnung von Klonüberständen

Befanden sich die Klone auf einer 96-Loch- bzw. einer 24-Loch-Platte, so wurde der Klonüberstand unter sterilen Bedingungen vorsichtig abpipettiert und für die jeweiligen Versuchszwecke verwendet.

Befanden sich die Klone bereits in einer Zellkulturflasche, wurde das Kulturmedium in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur mit 5.000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der den Antikörper enthaltende Überstand wurde steril in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit 0,02% Natriumazid versetzt und bei -20 °C bzw. +4 °C gelagert.

2.2.24 Durchführung eines direkten ELISA

Das Prinzip des direkten ELISA beruht auf einer spezifischen Epitoperkennung durch den Primärantikörper. Er erkennt das an die Platte gebundene Antigen und wird dadurch ebenfalls an die Platte gebunden. An diesen wiederum bindet ein Sekundärantikörper, der Spezies-spezifisch gegen IgG gerichtet ist und zur Detektion an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist.

Zur Vorbereitung wurde am Vorabend des Versuchs eine 96-Loch-Platte mit 50 µl Protein in einer Konzentration von 10 µg/ml in 1x PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte 3x mit 150 µl 1x PBS gewaschen, um nicht an die Platte gebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurde mit 100 µl 3% BSA / 1x PBS 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS wurde mit 50 µl des Primär-Antikörpers zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Als Primär-Antikörper diente bei den verschiedenen Versuchen:

- Mäuseserum
- Überstand des Klons
- YCC2 (1:1.000 Verdünnung in 3% BSA / 1x PBS)

Danach wurde viermal mit 1x PBS gewaschen und 50 µl eines HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörpers (1:10.000 in 3% BSA / 1x PBS verdünnt) für 1 Stunde inkubiert. Bei dem Anti-

körper YCC2 musste entsprechend Spezies-spezifisch ein HRP-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper (1:20.000 in 3% BSA / 1x PBS verdünnt) verwendet werden.

Abermals wurde viermal mit 1x PBS gewaschen und jeweils 100 µl Entwicklungslösung pro Vertiefung einpipettiert. Die Entwicklungslösung enthält H₂O₂, das als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase dient und eine Farbreaktion hervorruft, die spektrometrisch erfasst werden kann. Die 96-Loch-Platte wurde zum Ablauf der Entwicklungsreaktion für 20-30 Minuten lichtgeschützt gelagert und danach die Reaktion mit je 100 µl 5,3% H₂SO₄ (entspricht einer 18-fachen Verdünnung von 97-99% H₂SO₄) gestoppt. Innerhalb von 30 Minuten wurde die optische Dichte bei 450 nm mittels eines Microplate Reader von BioRad, München bestimmt.

2.2.25 Immunfluoreszenz

Das Prinzip der Immunfluoreszenz beruht auf einer spezifischen Epitoperkennung durch den Primär-Antikörper. Durch spezifische Bindung eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper kann die subzelluläre Lokalisation verschiedener Proteine bestimmt werden. Alternativ dazu ist aber auch eine Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe direkt an den Primär-Antikörper möglich. Diese Methode wurde aber nicht angewandt, da es das Ziel dieser Arbeit war, monoklonale Antikörper gegen das C-terminale Ende des menschlichen Polycystin-2 Proteins herzustellen. Hier musste ein Sekundärantikörper, an dem der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (rot fluoreszierend) gekoppelt war, verwendet werden.

Bei den für die Immunfluoreszenz verwendeten Zellen handelte es sich ausnahmslos um mittels DEAE-Dextran-Technik (siehe 2.2.19) transfizierte COS-7-Zellen. Drei Tage vor Durchführung der Immunfluoreszenz und somit am Vortag der Transfektion wurden 1,5 Millionen COS-7-Zellen auf eine Petrischale (Durchmesser 10 cm) in 15 ml DMEM / 10% FCS ausgesät. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin abgelöst und zur kurzzeitigen Aufbewahrung in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Daraufhin wurden auf die Petrischale autoklavierte, runde, unbeschichtete Glasplättchen gelegt und die Zellen in frischem DMEM / 10% FCS-Medium hinzugegeben, so dass die Zellen auf den Glasplättchen anwachsen konnten.

Am dritten Tag erfolgte die Durchführung der Immunfluoreszenz. Hierfür wurden die Glasplättchen entnommen, in eine 24-Loch-Platte überführt und zweimal kurz mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten mit 500 µl Bouin-Lösung bzw. 4% PFA fixiert. Nach erfolgreicher Fixierung wurde dreimal mit 1x PBS-Puffer gewaschen und mit 2% BSA / 0,1% Triton X-100 in 1x PBS pH 7,4 bei Raumtemperatur für 45 Minuten geblockt. Nach dem Absaugen der Blockierlösung wurde der Primärantikörper bei Raumtemperatur für zwei Stunden in 2% BSA / 1x PBS inkubiert. Als Positiv-Kontrolle diente OKT8 (1:30 verdünnt). Daraufhin wurde dreimal mit 1x PBS-Puffer gewaschen und der Sekundärantikörper in 2% BSA / 1x PBS bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Da dieser Antikörper fluoreszenzmarkiert ist, musste die Inkubation lichtgeschützt erfolgen. Abschließend wurden die Zellen dreimal je 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen und anschließend mittels Eindckmittel (40% Glycerin in 1x PBS) und Deckgläschchen auf Objektträgern eingebettet und bei 4°C über Nacht gelagert.

Am Folgetag wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Jena) betrachtet und die Bilder mittels einer CCD-Kamera (DMC2, Polaroid, Dreieich) auf einem daran angeschlossenen Computer übertragen, gespeichert und mit einer Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop 6.0) ausgewertet.

2.2.26 Immunpräzipitation

Für die erste Immunpräzipitation wurde Protein G Sepharose TM 4 Fast Flow der Firma Amersham Biosciences, Freiburg (Produktnummer 17-0618-01) verwendet.

Für die zweite Immunpräzipitation wurde Protein G Plus-Agarose Suspension der Firma Calbiochem (Cat. No. IP04) verwendet.

Pro zu testendem Antikörper wurden 12-15 µl mit Protein G gekoppelte Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert und zweimal mit 500 µl 1% Triton X-100 / 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Beads in ein PCR-Gefäß überführt und 250 µg des jeweiligen Zellysats hinzugegeben. Mit 1% Triton X-100 / 1x PBS wurde auf 200 µl aufgefüllt und 50 µl des zu testenden Antikörpers hinzugegeben.

Als Positiv-Kontrolle diente OKT8, als Negativ-Kontrolle 12CA5. Die PCR-Gefäße wurden bei 4°C für 4 Stunden rotierend inkubiert. Daraufhin wurde der Inhalt in eine leere Microspin S-200 HR Säule (der Firma Amersham Biosciences, Freiburg) überführt und die Beads mit 5,5 ml 1% Triton X-100 / 1x PBS gewaschen. Diese Methode wurde gewählt, um den Hintergrund zu minimieren. Mit 1.400 µl 1% Triton X-100 / 1x PBS wurden die Beads in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest abgenommen und verworfen. Der Vorgang wurde wiederholt, dieses Mal der restliche Überstand komplett abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 100 µl SDS-Proben-Puffer resuspendiert und konnte bei -80°C gelagert werden. Anschließend wurden die Proben auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot dargestellt.

Anmerkung:

Bei dem Western Blot für die Immunpräzipitation musste als Primärantikörper YCC2 (1: 4.000 in PBS verdünnt) und als Sekundärantikörper HRP-gekoppelter anti-Kaninchen IgG Antikörper (1: 20.000 verdünnt) verwendet werden, da ansonsten die leichte Kette des Maus-Antikörpers erkannt wurde.

2.2.27 Western Blot

Die Grundlage des Western Blots bildet der elektrophoretische Transfer der Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine proteinbindende PVDF-Membran. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Zum einen das Tank-Blotten, das hauptsächlich bei SDS-Polyacrylamidgelen der Größe 14 cm x 12 cm x 1,5 mm verwendet wurde, zum anderen das Semidry-Blotten, das in der Regel bei Gelen der Größe 8 cm x 4 cm x 0,75 mm bzw. 1 mm Anwendung fand.

Als Vorbereitung zum Blotten wurde nach Beendigung der Elektrophorese das Sammelgel verworfen und das Trenngel für 30 Sekunden in eine Schale mit dem jeweiligen Transferpuffer gelegt. Die auf die Größe des Trenngeles zugeschnittene PVDF-Membran wurde vor Gebrauch fünf Sekunden in 100% Methanol getaut und anschließend eine Minute in eine Schale mit dem jeweiligen Transferpuffer gelegt. Die auf die Größe des Trenngeles zugeschnittenen Whatman-Papiere wurden ebenfalls für 1 Minute mit dem jeweiligen Transferpuffer getränkt. Im Falle des Tank-Blottens wurden die zusätzlich verwendeten Schaumstoffpolster ebenfalls für eine Minute in den Transferpuffer gelegt.

- Tank-Blotten:

Hierfür wurde der Blot wie folgt zusammengebaut (von der Anode zur Kathode): Auf dem Träger der Blot-Vorrichtung wurde zuerst ein Schaumstoffpolster platziert, auf dem drei Lagen Whatman-Papiere, darüber die PVDF-Membran und darauf das Gel positioniert wurden. Darauf wurden weitere drei Lagen Whatman-Papiere hinzugefügt. Durch mehrmaliges Überrollen mittels eines Glasspatels wurden eventuell vorhandene Luftblasen zwischen Membran und Gel entfernt, um einen Transfer aller auf dem Gel vorhandener Proteine zu gewährleisten. Abschließend wurde darauf ein Schaumstoffpolster hinzugefügt, der Träger geschlossen und in die mit dem Transferpuffer gefüllte Blotvorrichtung gestellt. Der Transfer wurde bei 1 A für 2,5-3 Stunden unter ständiger Kühlung bei 10°C durchgeführt.

- Semidry-Blotten:

Hierfür wurde der Blot wie folgt zusammengebaut (von der Anode zur Kathode): Auf der Anoden-Platte wurden zunächst drei Lagen Whatman-Papier platziert, darauf die PVDF-Membran, darauf das Trenngel und darüber nochmals drei Lagen Whatman-Papier. Entsprechend wie beim Tank-Blotten wurden durch mehrmaliges Überrollen mittels eines Glasspatels eventuell vorhandene Luftblasen zwischen Membran und Gel entfernt, um einen Transfer aller auf dem Gel vorhandener Proteine zu gewährleisten. Abschließend wurde die Kathoden-Platte aufgelegt. Der Transfer wurde bei 24 V für 1 Stunde ohne Kühlung durchgeführt.

Nach erfolgreichem Transfer wurden auf der Rückseite der PVDF-Membran die Banden des Größenstandards mit einem Bleistift nachgezeichnet und die Membran anschließend entweder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler in Blockierlösung gelegt oder eine Stunde bei Raumtemperatur. Dieser Schritt diente dazu, unspezifische Bindungsstellen für Antikörper auf der Membran abzusättigen, damit diese die nachfolgenden Nachweisreaktionen nicht beeinträchtigten. Am Folgetag bzw. nach einer Stunde wurde die Membran mit dem in neuer Blocklösung verdünnten Primärantikörper eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurde viermal 5 Minuten mit der Waschlösung gewaschen, um überschüssige Antikörper, die keine Antigen-Antikörper-Bindung eingegangen waren, zu entfernen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Blockierlösung. Dieser war gegen das Spezies-spezifische IgG des Primärantikörpers gerichtet und zur Detektion an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Anschließend wurde abermals viermal 5 Minuten mit Waschlösung gewaschen sowie abschließend einmalig 5 Minuten mit 1x PBS-Puffer pH 7,4. Abschließend wurde die Membran mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus von Perkin Elmer behandelt. Hierfür wurde das Luminol-Reagenz mit der gleichen Menge an Oxidations-Reagenz gemischt und in einer Menge von 125 µl/cm² für eine Minute auf die Membran gegeben.

Daraufhin wurde die Membran in einer Klarsichthülle in eine Filmkassette gegeben, eventuell vorhandene Luftblasen zwischen Klarsichthülle und Membran entfernt und die Membran gegen Röntgenfilm exponiert. Um später auf dem Röntgenfilm abgebildete Banden eindeutig Bereichen auf der PVDF-Membran zuordnen zu können, wurden fluoreszierende Glogos Autorad Markers (Strategene) auf die Klarsichthülle geklebt.

Nach entsprechender Expositionszeit (zwischen 30 Sekunden und 1 Stunde) wurde der Film in Eukobrom-Entwickler gegeben und nach kurzem Schwenken in Wasser mit Acido Fixer 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach erfolgreichem Fixieren wurde der Film ausgiebig mit Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur zum Trocknen aufgehängt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbereitung

3.1.1 Gewinnung und Darstellung der Proteine

pET28aΔT7/PKD2C

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das C-terminale Ende des humanen Polycystin-2 Proteins bedurfte es eines Proteins, das den gesuchten Abschnitt von Polycystin-2 enthielt. Zudem musste es zur Immunisierung der Mäuse möglichst „rein“ vorliegen. Deshalb sollte das Protein mit üblichen Techniken einfach aufgereinigt werden können.

Dazu wurde das Plasmid pET28aΔT7/PKD2C, das für das C-terminale Ende des menschlichen Polycystin-2, gebunden an einen 6-fachen Histidin-Schwanz, kodiert, in den *E. coli*-Stamm Rosetta hineintransformiert. Der Rosetta-Bakterienstamm wurde als Expressionsstamm ausgewählt, da er das pRARE Plasmid enthält, durch welches die Synthese von eukaryontischen Proteinen erhöht wird (in diesem Fall des humanen Polycystin-2), wenn diese Proteine Kodons aufweisen, welche in „normalen“ *E. coli*-Stämmen selten vorhanden sind, beispielsweise AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA.

In einem Vorversuch wurde die Kinetik der Induktion bestimmt, so dass dann die eigentliche Induktion unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden konnte, um das gewünschte rekombinante Protein zu gewinnen (siehe 2.2.5).

Da der C-Terminus von humanem Polycystin-2 aufgrund des verwendeten Vektors pET28a an einen 6-fachen Histidin-Schwanz gebunden war, konnte das rekombinante Protein mittels Ni²⁺-Säule aufgereinigt (siehe 2.2.6) und die Proteinkonzentration bestimmt werden (siehe 2.2.8). Anschließend erfolgte die Umdialyse in 1x PBS-Puffer, da dieser schonender für die Immunisierung der Mäuse war. Durch Verwendung des Expressionsstamms Rosetta und unter optimalen Induktionsbedingungen betrug die Ausbeute an aufgereinigtem Protein ca. 6 mg pro 500 ml Kultursatz.

Die qualitative Beurteilung der Aufreinigung erfolgte durch Gel-Elektrophorese mit einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.2.10), das anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt wurde (Abb. 3.1). Da das rekombinante Protein später zur Immunisierung der Mäuse eingesetzt werden sollte, musste es sehr „sauber“ aufgereinigt werden, um eventuelle Immunisierungen gegen andere Proteine bzw. Proteinfragmente weitgehend zu minimieren bzw. auszuschließen. Dazu wurde anders als bei den übrigen in dieser Arbeit verwendeten Proteinen bis zu 40 µg pro Geltasche aufgereinigten Proteins mittels Gel-Elektrophorese auf seine Reinheit überprüft.

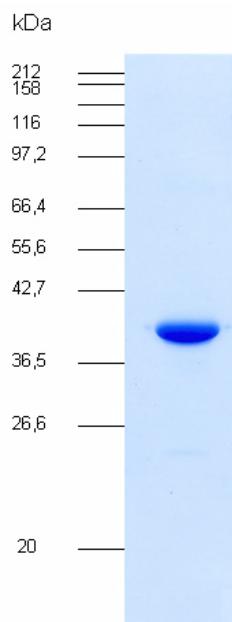


Abb. 3.1: Darstellung des aufgereinigten Proteins. 15 µg des aufgereinigten und in 1x PBS-Puffer umdialysierten rekombinanten Proteins wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt.

pGEX-4T-1/PKD2C

Da im Verlauf dieser Arbeit sichergestellt werden sollte, dass die gewonnenen monoklonalen Antikörper tatsächlich gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 gerichtet waren und nicht gegen den bei dem Immunisierungsprotein ebenfalls vorhandenen Histidin-Schwanz, war ein Protein nötig, das auch über das C-terminale Ende von Polycystin-2 verfügte, jedoch keinen Histidin-Schwanz besitzt.

Hierfür wurde das Plasmid pGEX-4T-1/PKD2C, das für ein GST-Fusionsprotein mit dem C-terminalen Ende von humanem Polycystin-2 kodiert und ursprünglicherweise von der Forschergruppe um S. Somlo stammt, zunächst in den Expressionsstamm BL21 (DE3) hineintransformiert. Da es sich bei dem rekombinanten Protein um ein GST-Fusionsprotein handelte, konnte die Aufreinigung mittels Glutathionsäule erfolgen (siehe 2.2.7). Analog dem zuvor beschriebenen Protein wurde auch das GST-Fusionsprotein aus dem elute-Puffer der Glutathion-Aufreinigung in 1x PBS-Puffer umdialysiert. Die qualitative Beurteilung der Reinheit nach der Aufreinigung erfolgte ebenfalls durch Gel-Elektrophorese mit einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel, das anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt wurde (Abb. 3.2). Das aufgereinigte Protein wurde später in Testungen der Überstände der Hybridomklone mittels ELISA und Western Blot verwendet.

Auch unter optimierten Induktionsbedingungen wurde lediglich eine Ausbeute von ca. 0,3 mg GST-Fusionsprotein pro 500 ml Kulturansatz erhalten, die für die Testungen der Hybridomklone jedoch viel zu gering war. Erst durch das Hineintransformieren des Plasmids in den Rosetta-Expressionsstamm, der, wie bereits beschrieben, die Synthese von eukaryontischen Proteinen erhöht, gelang es, die Ausbeute auf etwa 7 mg pro 500 ml Kulturansatz zu steigern.

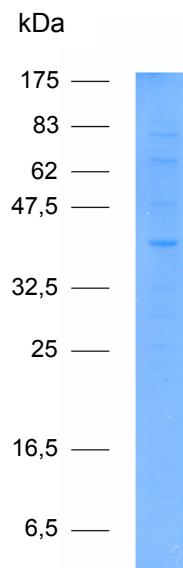


Abb. 3.2: Darstellung des aufgereinigten Proteins. 10 und 5 µg des aus Rosetta aufgereinigten und in 1x PBS-Puffer umdialysierten rekombinanten Proteins wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt.

pET21b/CIP1 (116/493)

Da im Verlauf dieser Arbeit sowohl die Seren der immunisierten Mäuse als auch später die Hybridomzellen auf Antikörper gegen den Histidin-Schwanz getestet werden sollten, bestand Bedarf nach einem Protein, das ähnlich dem rekombinanten Protein des Plasmids pET28aΔT7/PKD2C ebenfalls über einen 6-fachen Histidin-Schwanz verfügt, jedoch keine Strukturähnlichkeiten zum C-terminalen Ende von Polycystin-2 aufwies. Hierzu wurde das Plasmid pET21b/CIP1 (116/493) in den Expressionsstamm BL21 (DE3) hineintransformiert. Da durch den Vektor pET21b ein 6-facher Histidin-Schwanz kodiert wurde und keine Strukturähnlichkeit von CIP1 zu Polycystin-2 bestand, entsprach das rekombinante Protein den gewünschten Anforderungen. Durch den Histidin-Schwanz konnte das rekombinante Protein mittels Ni²⁺-Säule aufgereinigt und anschließend ebenfalls aus dem elute-Puffer in 1x PBS-Puffer umdialysiert werden. Die qualitative Kontrolle der Aufreinigung erfolgte mittels Gel-Elektrophorese mit einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel, das mit Coomassie-Lösung gefärbt wurde (Abb. 3.3).

Bei optimalen Induktionsbedingungen wurde eine Proteinausbeute von ca. 0,4 mg pro 500 ml Kulturansatz erzielt. Da dieses Protein nur in relativ geringen Mengen benötigt wurde, konnte die geringe Ausbeute akzeptiert werden.

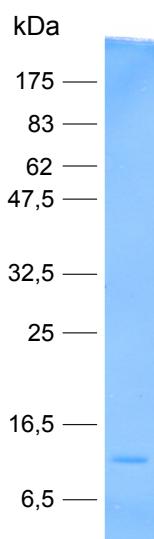


Abb. 3.3: Darstellung des aufgereinigten Proteins. 5 µg des aufgereinigten und in 1x PBS-Puffer umdialysierten rekombinanten Proteins wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt.

Neben den drei bereits beschriebenen Proteinen wurde im Rahmen dieser Arbeit noch ein GST-Fusionsprotein sowie ein rekombinantes Protein mit vierfachem Histidin-Schwanz verwendet, die keine Ähnlichkeit mit Polycystin-2 aufwiesen.

3.1.2 pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973)

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die hergestellten Antikörper nicht nur gegen aufgereinigtes Protein getestet werden, sondern auch die Funktion bei wesentlich geringeren Proteinkonzentrationen, wie sie z.B. in Zelllysaten vorliegt, getestet werden. Dazu wurde das Plasmid pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973), das die cDNA-Sequenz für das humane Polycystin-2 im Bereich des C-terminalen Endes sowie für das humane T-Zell-Oberflächen Glykoprotein (CD8) enthält, in den Klonierungsstamm DH5 α hineintransformiert. Die cDNA konnte mittels Plasmid-DNA-Midipräparation gewonnen (siehe 2.2.1) und die DNA-Konzentration bestimmt werden (siehe 2.2.2). Die cDNA-Ausbeute betrug ca. 33 µg pro 150 ml Kulturansatz. Zur Qualitätskontrolle wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind* III geschnitten und auf einem 1%igen Agarosegel dargestellt (Abb. 3.4).

Da das rekombinante Protein dieses Plasmids neben dem gewünschten C-terminalen Ende von Polycystin-2 auch CD8 enthielt, konnte bei den durchgeführten Versuchen als Positiv-Kontrolle OKT8 verwendet werden. Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper, der gegen CD8 gerichtet ist.

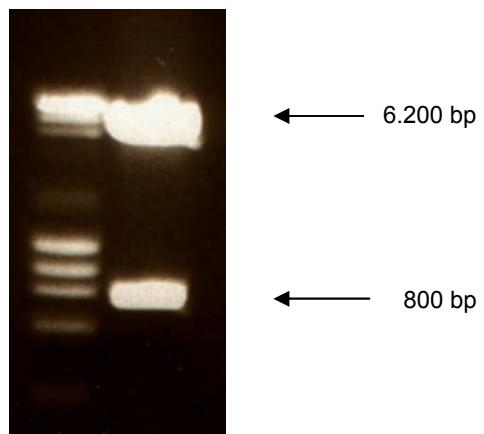


Abb. 3.4: Darstellung der DNA nach Testverdau. Die DNA des Konstrukts pCDNA3/CD8-PKD2C wurde mit dem Restriktionsenzym *Hind* III geschnitten und auf einem 1%igen Agarosegel dargestellt. Hierbei zeigten sich die charakteristischen Banden bei 6.200 bp und 800 bp.

3.2 Immunisierung der Mäuse

Nach erfolgreicher Aufreinigung des Proteinprodukts des Plasmids pET28a Δ T7/PKD2C erfolgte als nächster Schritt die Immunisierung von sechs 6 Wochen alten, weiblichen BALB/c-Mäusen mit diesem rekombinanten Protein nach dem in Abb. 3.5 gezeigten Schema.

Nach der Grundimmunisierung mit dem Proteinprodukt des Plasmids pET28a Δ T7/PKD2C in 50 µl 1x PBS-Puffer gemischt mit 125 µl Titermax Classic Adjunkt erfolgten drei Boosts im Abstand von jeweils 3 Wochen, wobei der erste und zweite Boost ähnlich der Grundim-

munisierung mit Titermax Classic Adjuvant und mittels subkutaner Injektion durchgeführt wurden. Das Adjuvans wurde eingesetzt, um eine starke Immunreaktion auszulösen und so eine möglichst hohe Antikörperproduktion gegen das gewünschte Antigen hervorzurufen. Die Boosts wurden durchgeführt, um eine möglichst starke Immunisierung der Mäuse zu gewährleisten. Bei dem dritten Boost wurde kein Adjuvans verwendet, da die Injektion intraperitoneal erfolgte.

Fünf Tage nach dem letzten Boost wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und die Milz entnommen, um die darin enthaltenen B-Lymphozyten mit spezifischer Antikörperproduktion gegen das C-terminale Ende des menschlichen Polycystin-2 mit den Myelomzellen der Zelllinie X63Ag8.6.5.3 zu fusionieren (siehe 2.2.18).

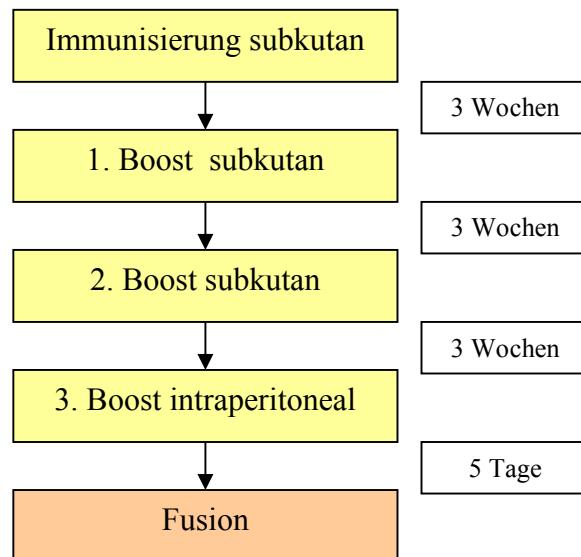
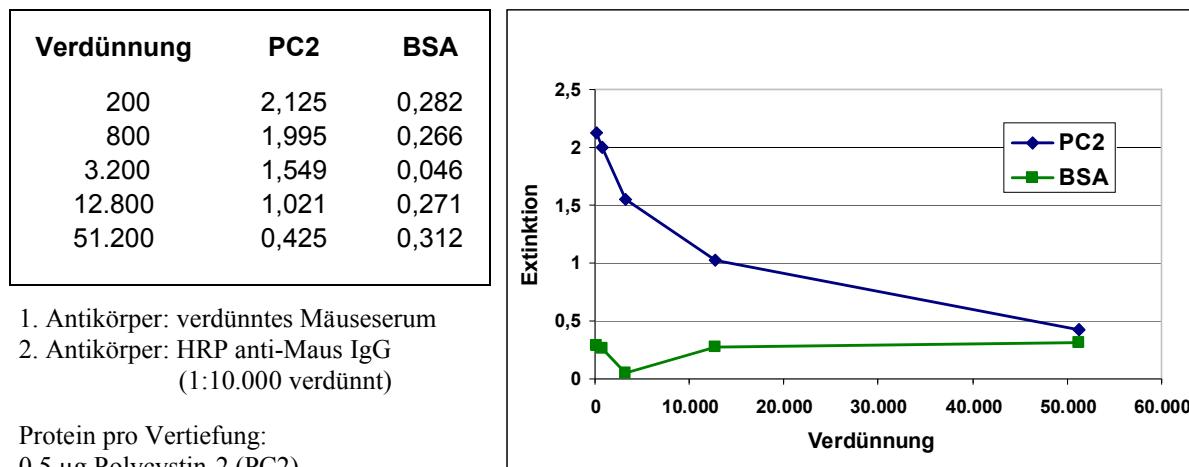
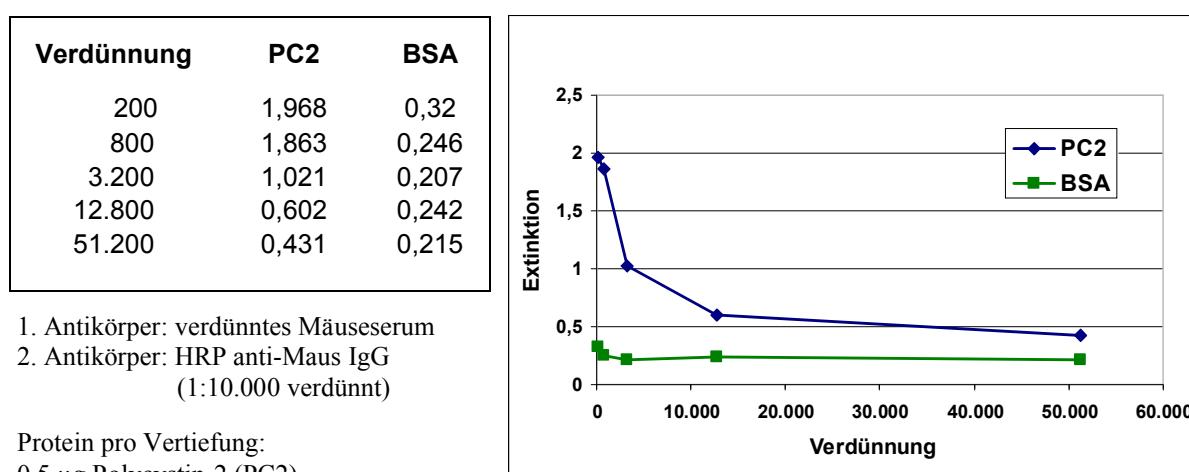
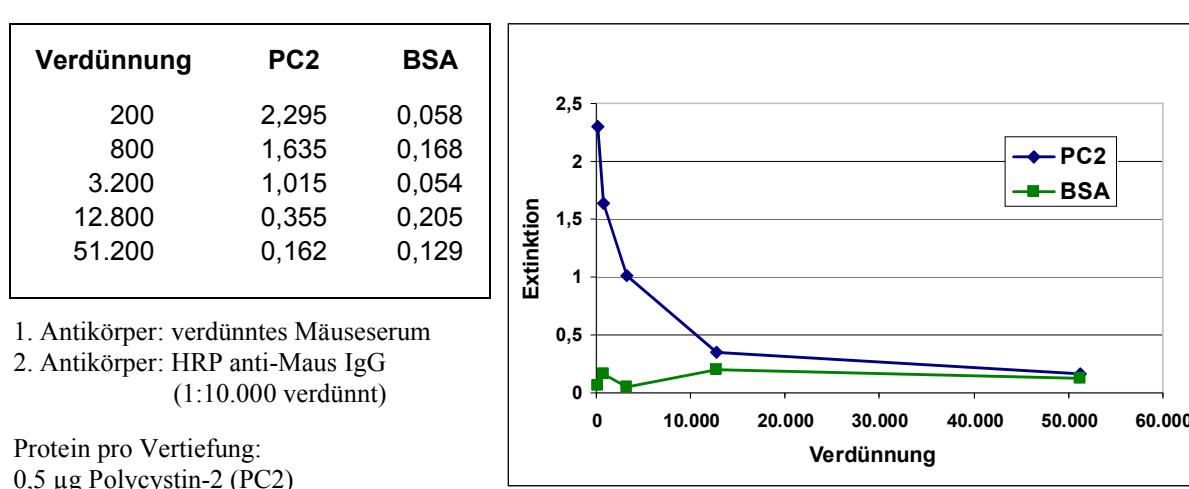


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Immunisierungsablaufes.

3.3 Erfolgskontrollen der Immunisierung

Bevor jedoch die Mäuse für die Fusion getötet wurden, erfolgte eine Erfolgskontrolle der Immunisierung. Hierfür wurde sechs Tage nach dem zweiten Boost Mäuseserum gewonnen (siehe 2.2.14) und mittels ELISA auf Antikörpern gegen das C-terminale Ende von humanem Polycystin-2 getestet (Abb. 3.6), um sicherzustellen, dass es überhaupt zu einer Immunisierung der Mäuse gekommen war. Dabei wurde BSA als Negativkontrolle verwendet. Zusätzlich wurden die Mäuse auf Antikörperbildung gegenüber dem Histidin-Schwanz getestet, um Mäuse mit besonders starker Immunisierung gegenüber dem Histidin-Schwanz von der Fusion auszuschließen. Hierfür wurde neben dem zur Immunisierung verwendeten rekombinanten Protein ein Protein verwendet, das keine Ähnlichkeit zu Polycystin-2 aufweist, jedoch über einen vergleichbaren Histidin-Schwanz verfügte.

Abb. 3.6a: Erfolgskontrolle der Immunisierung von Maus 393**Abb. 3.6b: Erfolgskontrolle der Immunisierung von Maus 394****Abb. 3.6c: Erfolgskontrolle der Immunisierung von Maus 420**

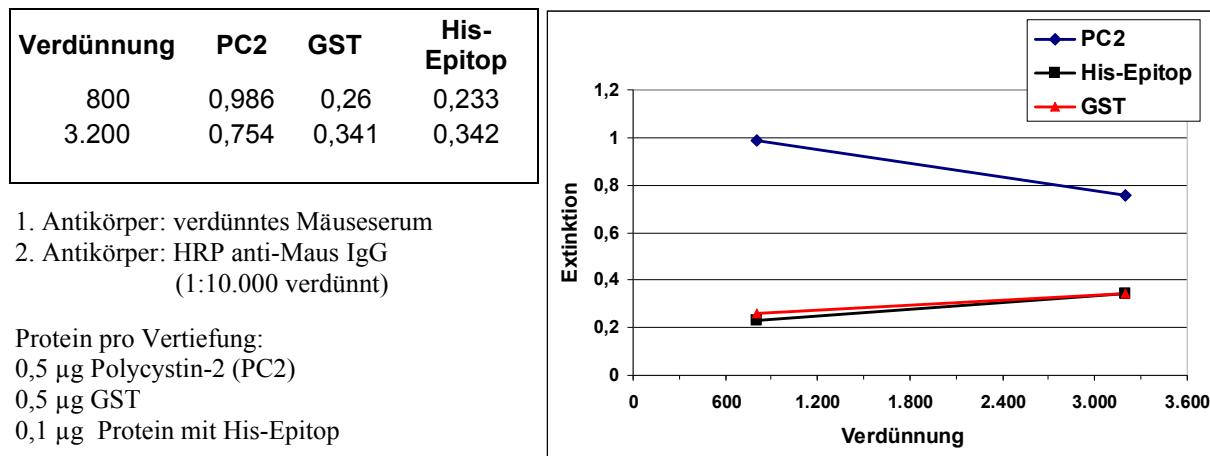


Abb. 3.6d: Erfolgskontrolle der Immunisierung von Maus 421

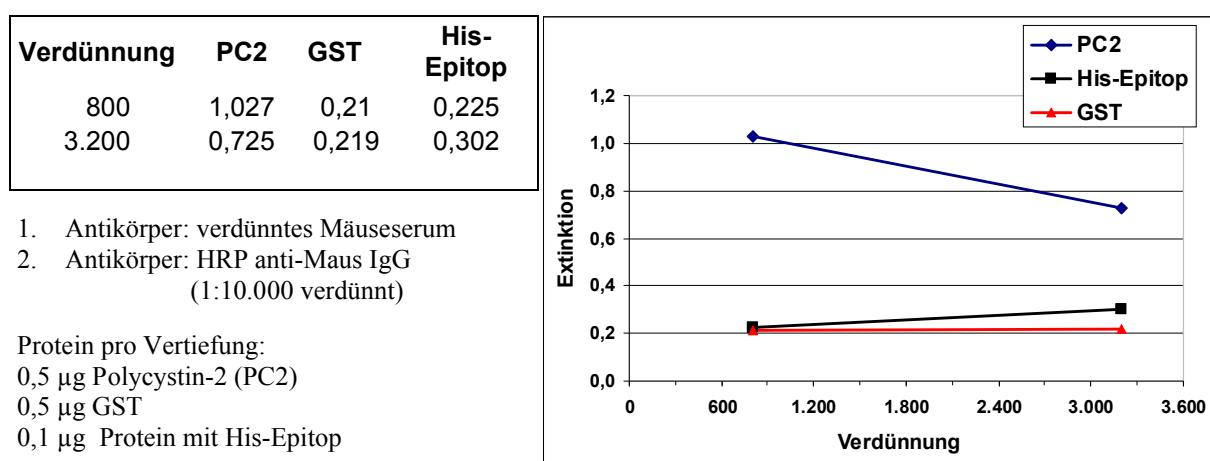
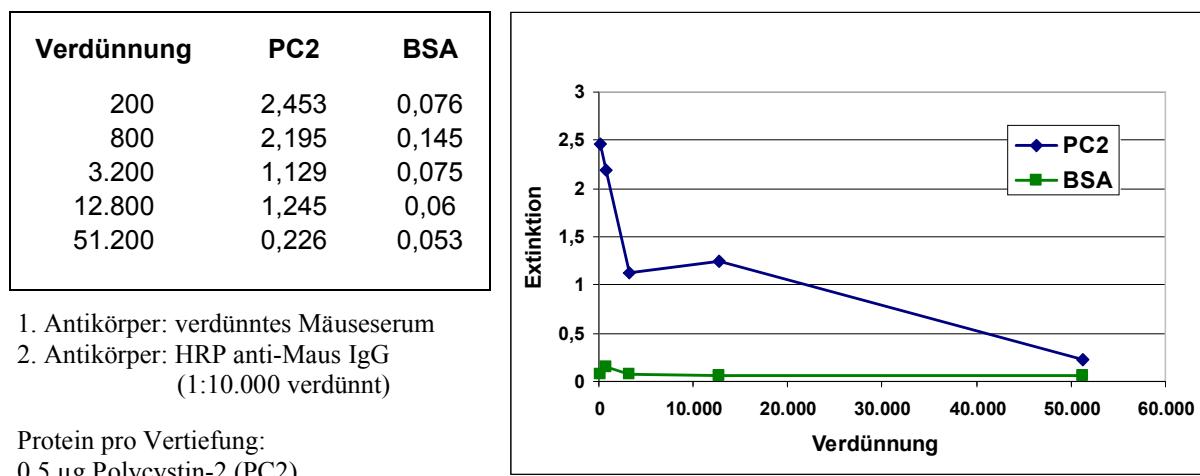


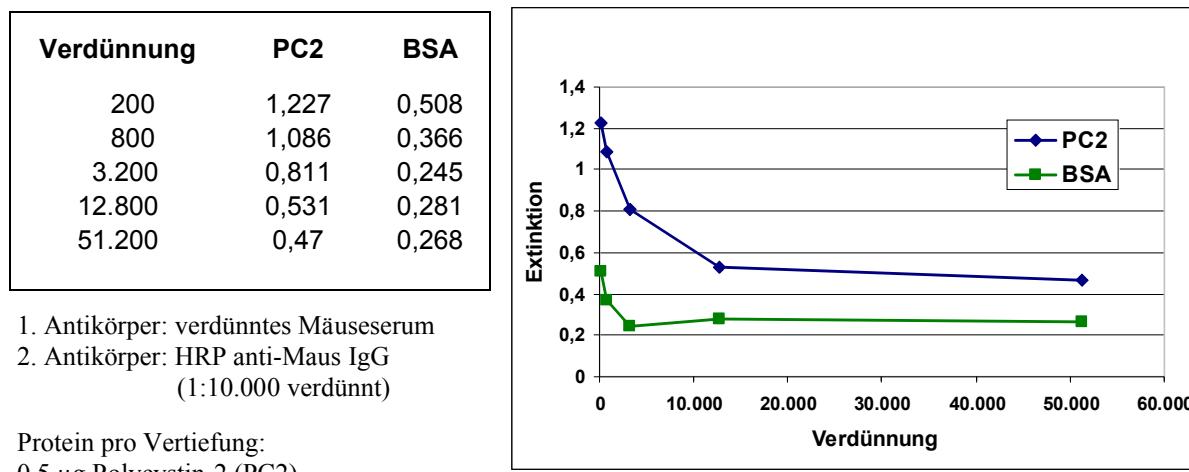
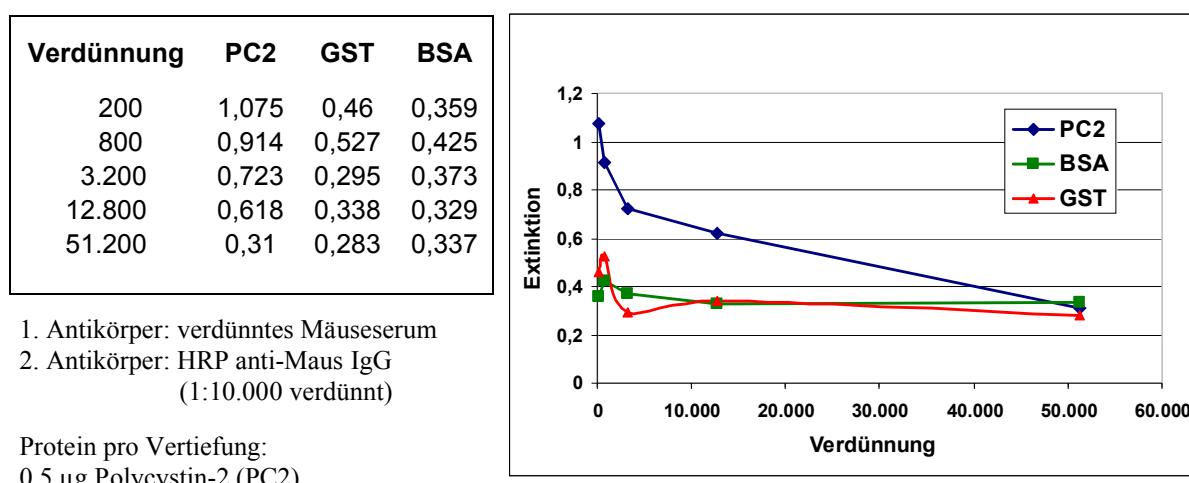
Abb. 3.6e: Erfolgskontrolle der Immunisierung von Maus 425**Abb. 3.6f: Erfolgskontrolle der Immunisierung von Maus 430**

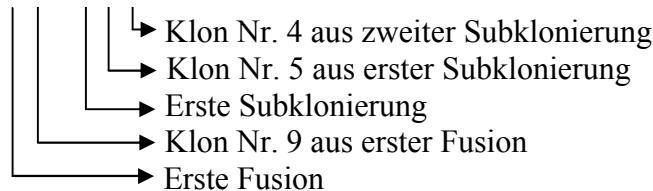
Abb. 3.6a-f: Erfolgskontrolle der Mäuseimmunisierung mittels ELISA. Um sicherzustellen, dass die immunisierten Mäuse tatsächlich Antikörper gegen den COOH-Terminus von Polycystin-2 produzierten, wurde den Mäusen am sechsten Tag nach dem zweiten Boost Blut abgenommen und das Serum im ELISA getestet. Pro Vertiefung wurden 0,5 µg des zur Immunisierung verwendeten rekombinanten Proteins aufgetragen bzw. 0,1 µg eines Proteins mit vierfachen Histidin-Schwanz jedoch ohne Anteile von Polycystin-2. Das GST-Fusionsprotein weist im Gegensatz zu dem zur Immunisierung verwendeten Protein keinen Histidin-Schwanz auf und diente neben BSA als Negativkontrolle, da es zudem auch über keinerlei strukturelle Ähnlichkeit zu Polycystin-2 verfügt. Als Kontrolle, ob eine Antikörperproduktion gegen den Histidin-Schwanz vorlag, diente ein Protein, das keine strukturelle Ähnlichkeit mit Polycystin-2 aufweist, jedoch über einem 4fachen Histidin-Schwanz verfügt. Als erster Antikörper wurde Serum der Mäuse 393, 394, 420, 421, 425 und 430 in verschiedenen Verdünnungen verwendet. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurde BSA verwendet. Als zweiter Antikörper diente HRP anti-Maus IgG in einer Verdünnung von 1:10.000. Es zeigte sich bei allen sechs Mäusen eine deutliche Antikörperproduktion gegen das zur Immunisierung verwendete Protein. Bei den später zur Zellfusion verwendeten Mäusen 420 und 421 konnte zusätzlich eine relevante Immunisierung gegen den Histidin-Schwanz ausgeschlossen werden.

3.4 Fusion und Testung mittels ELISA

Fünf Tage nach dem dritten Boost wurden zunächst die Mäuse 420 und 421 durch Genickbruch getötet, die Milz entnommen und die Fusion der B-Lymphozyten mit Zellen der Myelomzelllinie X63Ag8.653 durchgeführt (siehe 2.2.18). Hierbei wurde Maus 420 für die erste Fusion (F1), Maus 421 für die zweite Fusion (F2) verwendet.

Für die Bezeichnung der Klone wurde nachstehende Nomenklatur gewählt:

z.B.: F1-9 S1-5.4



Nach der Fusion wurden die 96-Loch-Platten erstmals nach 24 Stunden und dann im 2-3-tägigen Abstand mikroskopisch auf die Anzahl und das Wachstum der Kulturen pro Vertiefung überprüft. Am 8./9. Tag nach der Fusion wurden die 96-Loch-Platten mittels ELISA auf das Vorliegen von Klonen getestet, die Antikörper gegen den COOH-Terminus von Polycystin-2 produzierten (Durchführung eines ELISA siehe 2.2.24). Als Beispiel sei das Ergebnis von Fusion 2 Platte 3 in Tab. 3.1 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,446	0,121	0,164	0,152	1,115	0,145	0,345	0,186	0,328	0,813	0,518	0,509
B	0,284	0,54	1,641	1,552	0,211	0,058	0,296	0,423	0,515	0,15	0,053	0,187
C	1,063	0,433	0,309	0,089	1,171	1,532	0,828	0,569	0,171	0,588	0,177	0,239
D	0,977	0,105	0,139	0,518	0,642	0,306	0,156	0,248	0,322	0,159	0,678	0,75
E	0,122	0,983	0,718	2,189	0,343	0,164	0,3	0,527	0,205	0,206	0,621	0,118
F	0,142	0,245	0,56	0,507	0,217	0,117	0,213	0,552	0,33	0,23	0,712	0,176
G	0,524	0,553	0,363	0,165	0,244	0,761	0,174	0,172	0,103	0,075	0,122	0,139
H	0,267	0,109	0,45	0,187	0,492	0,221	0,201	0,166	0,09	0,246	0,139	0,258

Tab. 3.1: Screening auf positive Klone mittels ELISA. Pro Vertiefung wurden 0,5 µg des zur Immunisierung verwendeten Proteins (Proteinprodukt von pET28aΔT7/PKD2C) aufgetragen. Als erster Antikörper diente jeweils unverdünnter Klonüberstand sowie als Positiv-Kontrolle YCC2 (1:100 verdünnt). Das HAT-Medium wurde als Negativ-Kontrolle verwendet. Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt) bzw. HRP anti-Kaninchen IgG (1:20.000 verdünnt) verwendet. Hierbei zeigten einige Klone ähnliche Extinktionswerte wie die Positiv-Kontrolle. Bei den angegebenen Extinktionswerten handelt es sich um die reinen Messwerte ohne Abzug des Blindwertes. Die Klone wurden gemäß ihrer Extinktionswerte farblich gekennzeichnet und eingeteilt in:

	Klone mit einer Extinktion von 0,5-1
	Klone mit einer Extinktion >1
	Positiv-Kontrolle [1. Antikörper: YCC2 (1:1.000 verdünnt); 2. Antikörper HRP anti-Kaninchen IgG (1: 20.000 verdünnt)]
	Negativ-Kontrolle [statt 1. Antikörper HAT-Medium; 2. Antikörper HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt)]

Wie aus Tab. 3.1 ersichtlich wird, waren sehr viele der Klone im ELISA positiv. Das lag möglicherweise daran, dass lediglich 10 96-Loch-Platten zur Aussaat verwendet wurden und keine 20 Platten, wie in der Literatur oftmals beschrieben.

3.5 Zweiter ELISA zum Testen der Fusionen

Wegen der vielen positiven Klone wurde im nächsten Schritt versucht, in einem weiteren ELISA diejenigen Klone herauszufiltern, die gegen den Histidin-Schwanz gerichtet waren. Dazu wurde das Proteinprodukt von pGEX-4T-1/PKD2C, das keinen Histidin-Schwanz aufweist, verwendet. Für Antikörper eines Klons, die gegen den Histidin-Schwanz gerichtet waren, würde man bei den mit dem Proteinprodukt von pET28aΔT7/PKD2C beschichteten Vertiefungen eine hohe Extinktion erwarten, während sie bei den mit dem Proteinprodukt von pGEX-4T-1/PKD2C beschichteten Vertiefungen gleich der Negativ-Kontrolle sein müsste. Um von vornherein die Anzahl der Klone etwas einzuschränken, wurden nur diejenigen verwendet, die im Falle der Fusion 1 Werte $> 1,5$ bzw. im Falle der Fusion 2 Werte $> 1,2$ lieferten. Damit blieben immer noch 48 Klone aus Fusion 1 und 44 aus Fusion 2 übrig, die weiter getestet wurden.

Als Beispiel sei das Ergebnis der zweiten Testung von Fusion 1 und Fusion 2 (Platte 2) in Tab. 3.2 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	His	GST										
A	1,316	1,218	0,888	0,89	0,919	0,688	0,837	0,378	1,881	1,001	1,297	1,258
B	1,623	1,341	1,089	0,505	0,889	0,412	1,166	0,346	0,74	0,537	1,633	1,684
C	0,788	0,329	1,532	0,471	0,73	0,693	0,809	0,508	0,538	0,115	1,445	1,455
D	0,641	0,308	1,037	0,625	0,762	0,908	0,596	0,487	0,722	0,353	0,867	0,733
E	0,639	0,502	0,895	0,498	0,856	0,788	0,885	1,092	1,003	0,864	0,791	0,618
F	0,594	0,198	0,863	0,691	0,884	0,606	0,573	0,474	0,843	0,162	1,611	0,628
G	0,924	0,668	1,32	0,175	0,988	1,014	0,741	0,641	0,794	0,735		1,342
H	1,123	0,529	0,775	0,974	1,677	0,699	0,727	0,205	0,62	0,384	0,052	0,048

Tab. 3.2: Test auf positive Klone mittels ELISA. Pro Vertiefung wurden $0,5 \mu\text{g}$ des zur Immunisierung verwendeten COOH-Terminus von Polycystin-2 aufgetragen (His), bzw. $0,5 \mu\text{g}$ des GST-Fusionsproteins, das ebenfalls den COOH-Terminus von Polycystin-2 enthält, jedoch keinen Histidin-Schwanz aufweist (GST). Als erster Antikörper diente jeweils unverdünnter Überstand, sowie zur Positiv-Kontrolle YCC2 (1:1.000 verdünnt). Zur Bestimmung des Hintergrunds wurde statt des ersten Antikörpers Kulturmedium verwendet. Als zweiter Antikörper diente HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt) bzw. HRP anti-Kaninchen IgG (1:20.000 verdünnt). Bei den angegebenen Extinktionswerten handelt es sich um die reinen Messwerte ohne Abzug des Blindwertes. Die Klone wurden gemäß ihrer Extinktionswerte farblich gekennzeichnet und eingeteilt in:

Klone mit einer Extinktion von 0,5-1
Klone mit einer Extinktion > 1
Positiv-Kontrolle [1. Antikörper: YCC2 (1:100 verdünnt), 2. Antikörper HRP anti-Kaninchen IgG (1:20.000 verdünnt)]
Negativ-Kontrolle [statt 1. Antikörper Kulturmedium, 2. Antikörper HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt)]

Da nur sehr wenige Klone Antikörper gegen den Histidin-Schwanz zu produzieren schienen, war das Problem damit allerdings noch nicht gelöst. Deshalb wurde entschieden, nach folgenden Kriterien einige Klone versuchsweise zur weiteren Testung auszuwählen:

1. Mit Extinktion > 1,0 bei dem Proteinprodukt von pET28aΔT7/PKD2C und dem GST-Fusionsprotein
2. Mit Extinktion > 1,0 nur bei dem GST-Fusionsprotein
3. Mit Differenz > 0,5 zwischen der Extinktion bei dem Proteinprodukt von pET28aΔT7/PKD2C und dem GST-Fusionsprotein

Als Beispiel sei das Ergebnis der zweiten Testung von Fusion 1 und Fusion 2 (Platte 2) in Tab. 3.3 schematisch dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	His	GST										
A	1,316	1,218	0,888	0,89	0,919	0,688	0,837	0,378	1,881	1,001	1,297	1,258
B	1,623	1,341	1,089	0,505	0,889	0,412	1,166	0,346	0,74	0,537	1,633	1,684
C	0,788	0,329	1,532	0,471	0,73	0,693	0,809	0,508	0,538	0,115	1,445	1,455
D	0,641	0,308	1,037	0,625	0,762	0,908	0,596	0,487	0,722	0,363	0,867	0,733
E	0,639	0,502	0,695	0,498	0,856	0,788	0,885	1,092	1,003	0,864	0,791	0,618
F	0,594	0,198	0,863	0,691	0,884	0,606	0,573	0,474	0,843	0,162	1,611	0,628
G	0,924	0,668	1,32	0,175	0,988	1,014	0,741	0,641	0,794	0,735		1,342
H	1,123	0,529	0,775	0,974	1,677	0,699	0,727	0,205	0,62	0,384	0,052	0,048

Tab. 3.3: Darstellung der Auswertung des Tests auf positive Klone mittels ELISA. Pro Vertiefung wurden 0,5 µg des zur Immunisierung verwendeten COOH-Terminus von Polycystin-2 aufgetragen (His), bzw. 0,5 µg des GST-Fusionsproteins, das ebenfalls den COOH-Terminus von Polycystin-2 enthält, jedoch keinen Histidin-Schwanz aufweist (GST). Als erster Antikörper diente jeweils unverdünnter Überstand, sowie zur Positiv-Kontrolle YCC2 (1:1.000 verdünnt). Zur Bestimmung des Hintergrunds wurde statt des ersten Antikörpers Kulturmedium verwendet. Als zweiter Antikörper diente HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt) bzw. HRP anti-Kaninchen IgG (1:20.000 verdünnt). Bei den angegebenen Extinktionswerten handelt es sich um die reinen Messwerte ohne Abzug des Blindwertes. Die Klone wurden gemäß ihrer Extinktionswerte farblich gekennzeichnet und eingeteilt in:

	positive Klone mit Extinktion > 1,0 bei dem Proteinprodukt von pET28aΔT7/PKD2C und dem GST-Fusionsprotein
	positive Klone mit Extinktion > 1,0 nur bei dem GST-Fusionsprotein
	positive Klone mit Differenz der Extinktion > 0,5 zwischen dem Proteinprodukt von pET28aΔT7/PKD2C und dem GST-Fusionsprotein
	Positiv-Kontrolle YCC2
	Negativ-Kontrolle [statt 1. Antikörper Kulturmedium, 2. Antikörper HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt)]

Dabei zeigte sich, dass die Mehrzahl der Klone Antikörper gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 produzierten. Darunter gab es welche, die sowohl mit dem zur Immunisierung verwendeten Protein als auch mit dem GST-Fusionsprotein hohe Extinktionswerte lieferten. Keiner der Klone schien Antikörper gegen den Histidin-Schwanz zu produzieren. Daneben gab es auch Klone, deren Überstände höhere Extinktionswerte lieferten, wenn die Vertiefungen mit dem GST-Fusionsprotein beschichtet waren als mit dem zur Immunisierung verwendeten rekombinanten Protein.

3.6 Western Blot zur Bestätigung der Testung

Obwohl sich mittels ELISA die spezifische Antikörperproduktion der Klone gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 prinzipiell nachweisen ließ, musste aufgrund der übermäßig vielen positiven Klone der ELISA als geeignete Screeningmethode hinterfragt werden. Deshalb erfolgte die Testung von insgesamt 25 Klonen, die aus dem zweiten ELISA nach dem oben beschriebenen Muster ausgewählt wurden, mittels Western Blot (Durchführung des Western Blots siehe 2.2.27). Hierfür wurden die in Abb. 3.4 aufgelisteten Proteine verwendet, um die Spezifität der von den Klonen produzierten Antikörper gegenüber dem Histidin-Schwanz bzw. dem C-terminalen Ende von Polycystin-2 nachzuweisen.

Plasmid	Protein	Proteingröße
pGEX-4T-1/PKD2C	Polycystin-2, ohne Histidin-Schwanz	~ 45 kDa
pET28a ΔT7/PKD2C	Polycystin-2, mit Histidin-Schwanz	~ 40 kDa
pET21b/CIP1 (116/493)	Protein ohne Ähnlichkeit zu Polycystin-2, mit Histidin-Schwanz	~ 13 kDa

Tab. 3.4: Übersicht über die im Western Blot verwendeten Proteine.

Wie in Tab. 3.5 dargestellt, sollten in den Western Blots bei hoher Spezifität 2 Banden, bei völliger Unspezifität dagegen 3 Banden zu sehen sein. Bei Spezifität gegen den C-Terminus von Polycystin-2 ist für das Protein ohne Histidin-Schwanz eine Bande bei ~45 kDa, dem Protein mit Histidin-Schwanz eine Bande bei ~40 kDa zu erwarten, jedoch keine Bande bei ~13 kDa, da hier das C-terminale Ende von Polycystin-2 nicht vorhanden ist. Das Auftreten dieser Bande im Western Blot, gemeinsam mit den beiden vorher beschriebenen Banden, würde auf einen Klon mit unspezifischer Antikörperproduktion hinweisen. Bei Spezifität gegen den Histidin-Schwanz müssten Banden bei ~40 kDa und ~13 kDa für die beiden Proteine mit Histidin-Schwanz auftreten. Damit sollten sich diejenigen Klone herausfiltern lassen, die spezifisch gegen Polycystin-2 gerichtete Antikörper produzieren.

Protein	Proteingröße	unspezifisch	anti-Histidin-Schwanz	anti-PC2
Polycystin-2, ohne Histidin-Schwanz	~ 45 kDa	+	-	+
Polycystin-2, mit Histidin-Schwanz	~ 40 kDa	+	+	+
Protein ohne Ähnlichkeit zu Polycystin-2, mit Histidin-Schwanz	~ 13 kDa	+	+	-

Tab. 3.5: Schema der möglichen Anzahl der Banden und Lage im Western Blot je nach Spezifität der Klone.
Dabei bedeuten: „+“ = Bande vorhanden; „-“ = keine Bande vorhanden.

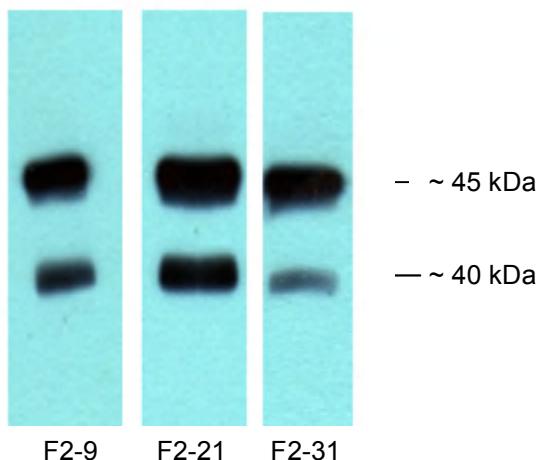


Abb. 3.7: Western Blot zur Bestätigung der ELISA-Befunde. 40 µg des durch pGEX-4T-1/PKD2C kodierten Fusionsproteins, 20 µg des Proteinproduktes von pET28aΔT7/PKD2C sowie 10 µg des Proteinproduktes von pET21b/CIP1 (116/493) wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper diente der jeweilige Klonüberstand, beispielsweise von F2-9, F2-21, F2-31 in einer Verdünnung von 1:10 in Blocklösung. Als zweiter Antikörper diente HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt) in Blocklösung. Die Expositionszeit betrug 1,5 Minuten. Es zeigten sich Banden bei ~45 kDa sowie bei ~40 kDa, allerdings nicht bei ~13 kDa. Somit waren die produzierten Antikörper spezifisch für das C-terminale Ende von Polycystin-2 und nicht für den Histidin-Schwanz.

Die Auswertung der Western Blots ergab, dass 12 von 25 getesteten Klonen spezifische Antikörper gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 produzierten. Davon wurden alle 12 Klone für die Massenkultur ausgewählt, die restlichen wurden weggefroren. Weitere 5 Klone produzierten unspezifische Antikörper. Bei den restlichen Klonen konnten keine Banden nachgewiesen werden, es fand sich auch kein Klon mit spezifischer Antikörperproduktion gegen den Histidin-Schwanz.

3.7 Testungen der Klone

Nachdem die Klone mittels ELISA und Western Blot getestet waren, blieben noch sieben positive Klone aus Fusion 1 und fünf positive Klone aus Fusion 2 übrig. Für die weitere Entscheidung, welche Klone subkloniert werden sollten, wurden die Klone nochmals mittels Western Blot, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz getestet.

3.7.1 Testung mittels Western Blot

Bei der zuvor beschriebenen Testung der Klone mittels Western Blot wurde stets aufgereinigtes Protein, das in Bakterien synthetisiert worden war, verwendet. Die Antikörper sollten jedoch auch bei wesentlich geringeren Proteinkonzentrationen, wie sie z.B. in Zelllysaten vorliegen, zuverlässig eingesetzt werden können. Dazu wurde Zelllysat von transfizierten COS-7-Zellen verwendet (Durchführung der Transfektion von COS-7-Zellen siehe 2.2.21, und Gewinnung des Zelllysates von transfizierten COS-7-Zellen siehe 2.2.22), die mit dem Plasmid pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973) transfiziert wurden. Als Negativ-Kontrolle diente das Zelllysat von COS-7-Zellen, die mit pBluescript (-) DNA transfiziert worden waren. Hierbei konnten lediglich 4 der 7 Klone aus Fusion 1 (F1-17, F1-27, F1-47 und F1-48) sowie einer der 5 Klone aus Fusion 2 (F2-9) erfolgreich getestet werden.

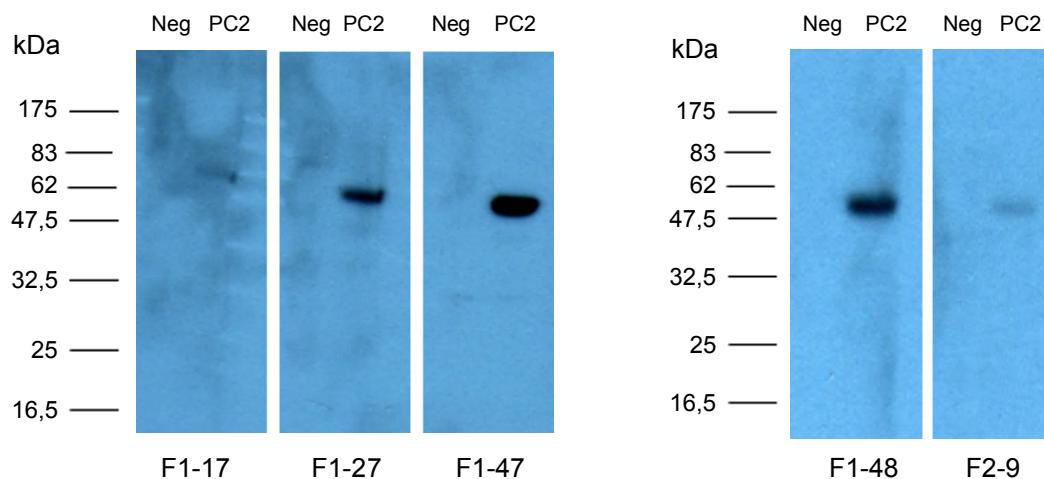


Abb. 3.8: Testung der Klone mittels Western Blots (mit Protein aus Zellysat). Je 20 µg Protein des Zellysats von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973) (PC2) bzw. mit pBluescript (-) (Neg) transfiziert worden waren, wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper dienten die Klonüberstände von F1-17, F1-27, F1-47, F1-48 sowie F2-9 jeweils 1:10 verdünnt in Blocklösung. Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt in Blocklösung) verwendet. Die Expositionszeit betrug 3 Minuten. Hierbei zeigten sich bei allen fünf Klonen die spezifische Bande bei PC2 und keine in der jeweiligen Negativ-Kontrolle.

3.7.2 Testung mittels Immunpräzipitation

Die restlichen fünf Klone wurden nun mittels Immunpräzipitation getestet (Durchführung der Immunpräzipitation siehe 2.2.26). Dazu wurde das Zellysat von COS-7-Zellen benutzt, die mit pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973) transfiziert wurden. Als Negativ-Kontrolle diente das Zellysat von COS-7-Zellen, die mit pBluescript (-) DNA transfiziert worden waren. Als Positiv-Kontrolle diente hierbei der Antikörper OKT8 (gegen CD8 gerichtet) und als Negativ-Kontrolle der Antikörper 12CA5 (gegen HA-Epitop gerichtet). Dabei erwiesen sich nur drei der getesteten Klone (F1-17, F1-47 und F2-9) weiterhin als wirksam.

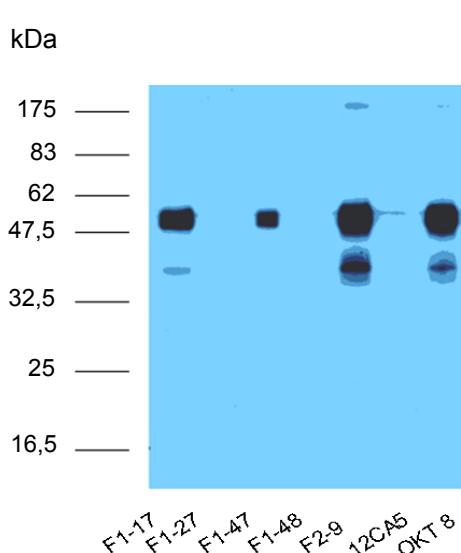
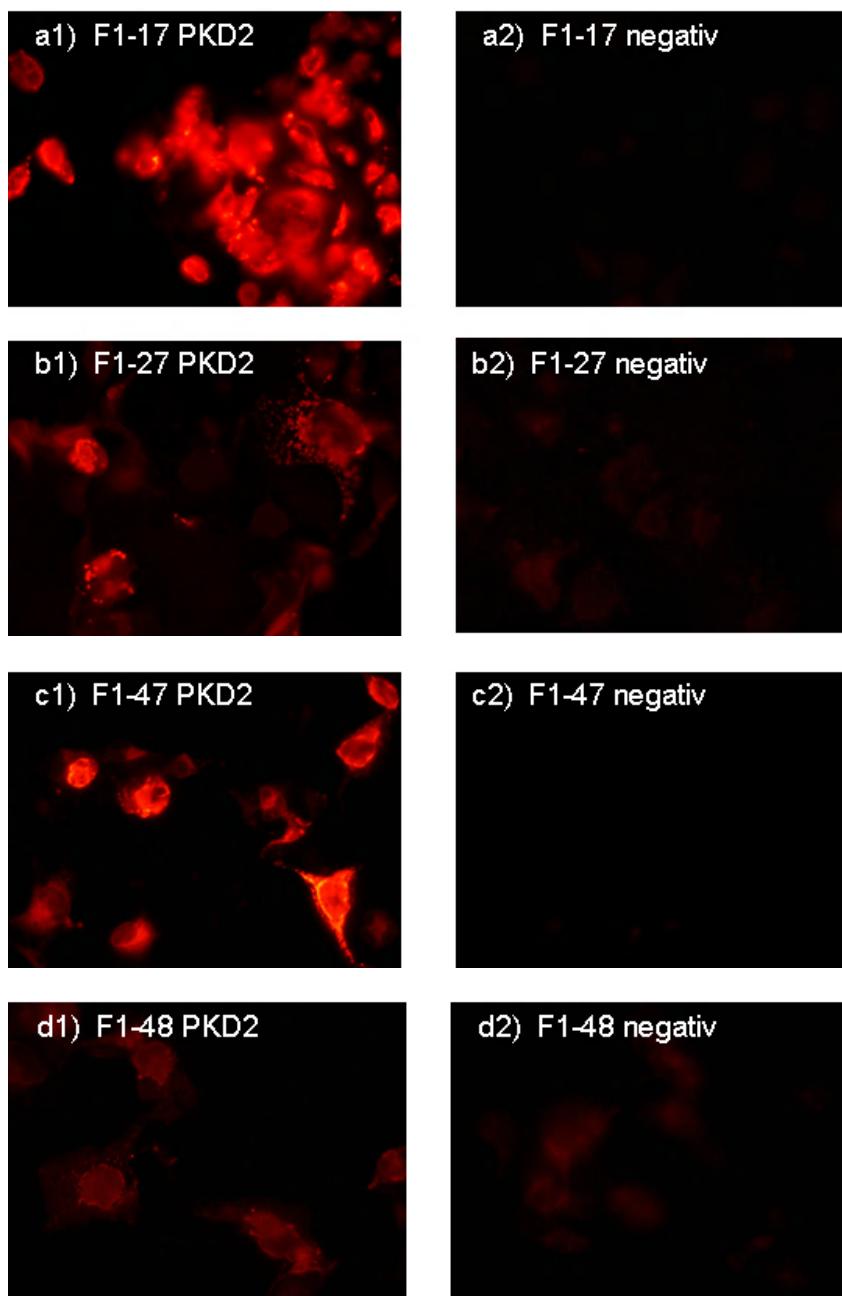


Abb. 3.9: Testung der Klone mittels Immunpräzipitation. Je 12-15 µl mit Protein G beschichtete Beads wurden zusammen mit 250 µg Zellysat von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973) transfiziert wurden, sowie 50 µl des zu testenden Antikörpers bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und das Pellet in 100 µl SDS-Poben-Puffer resuspendiert. Davon wurden jeweils 25 µl auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper diente YCC2, ein polyklonaler Antikörper gegen Polycystin-2 (1:6.000 verdünnt in Blocklösung). Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Kaninchen IgG (1:20.000 verdünnt in Blocklösung) verwendet. Die Expositionszeit betrug 30 Sekunden. Hierbei zeigten sich sowohl in der Positiv-Kontrolle sowie bei Klon F1-17, F1-47 und F2-9 deutliche Banden.

3.7.3 Testung mittels Immunfluoreszenz

Die im Western Blot mit Zelllysat positiv getesteten 5 Klone (F1-17, F1-27, F1-47, F1-48 und F2-9) wurden auch noch mittels Immunfluoreszenz getestet. Dazu wurde ebenfalls COS-7-Zellen benutzt, die mit pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973) transfiziert wurden. Als Positiv-Kontrolle wurde der Antikörper OKT8 verwendet und zur Negativ-Kontrolle dienten COS-7-Zellen, die mit pBluescript (-) DNA transfiziert wurden. Bei spezifischer Antikörperproduktion der Klone sollte sich mit der Immunfluoreszenz das endoplasmatische Retikulum anfärben lassen.

Es zeigte sich, dass alle fünf Klone in der Immunfluoreszenz erfolgreich getestet werden konnten (Abb. 3.10). Bei den Klonen F1-27 und F1-48 zeigte sich in der Negativkontrolle ein stärkerer Hintergrund als bei der Positivkontrolle und den übrigen Klonen.



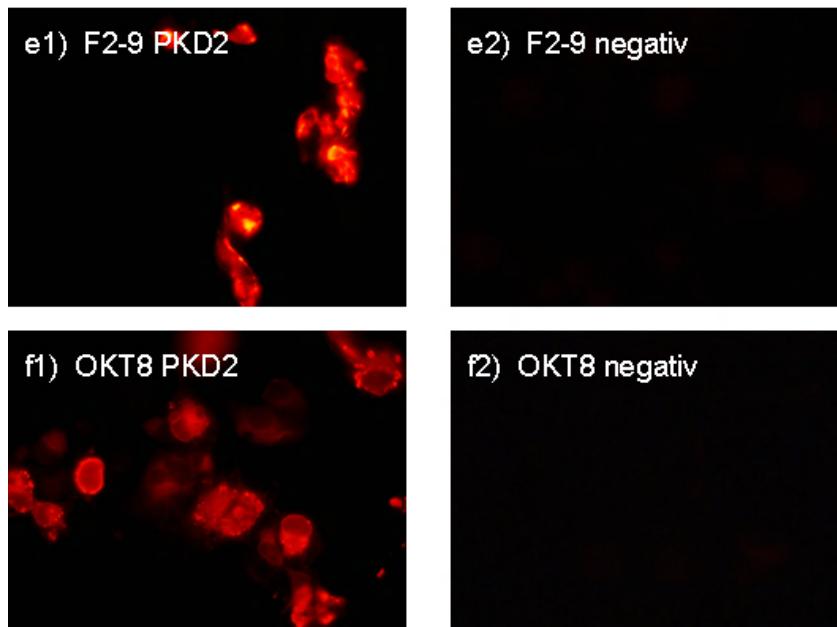


Abb. 3.10: Testung der Klone mittels Immunfluoreszenz. Mit pcDNA3/CD8-PKD2 (2104/2973) transfizierte COS-7-Zellen (PKD2) bzw. zur Bestimmung des Hintergrunds mit pBluescript (-) transfizierte COS-7-Zellen (negativ) wurden mit Bouin-Reagenz fixiert. Als erster Antikörper diente Überstand der Klone F1-17, F1-27, F1-47, F1-48, F2-9. Als Positiv-Kontrolle wurde OKT8, ein gegen CD8 gerichteter Antikörper, verwendet. Als zweiter Antikörper diente Cy-3 anti-Maus IgG (1:400 verdünnt in 2%igem BSA / 1x PBS). Hierbei konnten alle Klone das CD8-Polyzystin-2 Fusionsprotein im endoplasmatischen Retikulum darstellen. Jedoch lieferten die Klone F1-27 und F1-48 vermehrten Hintergrund.

3.8 Versuche des Mediumwechsels

Wie in 3.12 beschrieben, erfolgte nach ca. 3-4 Wochen die Umsetzung der Klone vom HAT-Medium in das HT-Medium, da es nicht länger notwendig war, einen der beiden Stoffwechselwege mittels Aminopterin zu unterdrücken. Dazu wurden die Klone aus dem HAT-Medium 1:3 in das HT-Medium gesplittet. In letzterem befanden sich die Klone auch zum Zeitpunkt der zuvor beschriebenen Testungen.

Bevor die Klone jedoch in HT-Medium überführt wurden, bestand das Bestreben, die Klone sofort in das Standardmedium bestehend aus 90% RPMI 1640 und 10% FCS umzusetzen. Nachdem dies zunächst scheiterte, wurden mehrere Versuche unternommen, die Klone vom HAT-Medium zu entwöhnen, wie in Tab. 3.6 dargestellt.

Es ergaben sich keine zufriedenstellenden Ergebnisse, deshalb wurde der Versuch, das Medium zu wechseln, aufgegeben und die Subklonierung durchgeführt.

	Vorgehen	Verwendetes Medium	Ergebnis
1	Die Klone wurden bei 750 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen resuspendiert.	90% RPMI 1640 10% FCS	Keine Teilungen der Zellen und Absterben aller Zellen nach ca. 4 Tagen.
2	Siehe Versuch 1.	90% RPMI 1640 10% FCS 0,05% β -Mercaptoethanol	Siehe Versuch 1.
3	Die Klone wurden 1:1 in das neue Medium gesplittet.	50% HT-Medium 50% Medium aus Versuch 2	Zwar überlebten von den Zellen nach 4 Tagen ca. 60 %, allerdings zeigten diese kaum Teilungstendenzen.
4	Die in Versuch 3 überlebenden Klone wurden nach 4 Tagen 1:1 in das neue Medium gesplittet.	25% HT-Medium 75% Medium aus Versuch 2	Nach ca. 2 Tagen waren alle Zellen abgestorben.
5	Siehe Versuch 4.	50% HT-Medium 50% Medium aus Versuch 2	Zwar überlebten immer noch ca. 30 % der Zellen, allerdings zeigten sie keinerlei Teilungstendenzen.

Tab. 3.6: Ergebnisdarstellung der Versuche des Mediumwechsels.

3.9 Subklonierung

Aufgrund des ca. 24-stündigen Teilungszyklus der Zellen konnten am zweiten Tag 2 oder mehr Zellen pro Vertiefung vorhanden sein. Da keine Unterscheidung möglich war, ob es sich bei diesen wirklich um jeweils zwei identische Klone oder um verschiedene Zellen handelte, wurden mit den fünf Klonen zwei Subklonierungen durchgeführt, um die Monoklonalität des Antikörpers sicherzustellen.

3.10 Erste Subklonierung

3.10.1 Erster Versuch

Die Subklonierung erfolgte gemäß 2.2.19, indem die Klone bis zu einer Dichte von 50.000 – 350.000 Zellen / ml Medium wachsen gelassen und anschließend mit einer Konzentration von 1 Zelle / Vertiefung auf zwei 96-Loch-Platten ausplattiert wurden, wobei je Vertiefung 100 μ l frisches HT-Medium verwendet wurde.

Am zehnten Tag nach der Subklonierung wurden die gewachsenen Klone mittels ELISA auf die Produktion spezifischer Antikörper gegen das C-terminale Ende des menschlichen Polycystin-2 überprüft. Der Grund hierfür war, dass für die Fusionen jeweils nur zehn 96-Loch-Platten verwendet worden waren und somit eine hohe Wahrscheinlichkeit gegeben war,

dass sich möglicherweise zwei oder mehr Klone in einer Vertiefung befunden hatten. Wie sich bereits in den vorausgegangenen Versuchen zeigte, lieferte die Testung mittels ELISA viele positive Antikörper, die sich dann im Western Blot teilweise als unspezifisch erwiesen. Deshalb wurden jetzt die Antikörper der Subklone immer neben ELISA auch mittels Western Blot als Bestätigungstest der Spezifität gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 getestet. Diese Vorgehensweise wurde auch bei allen nachfolgenden Versuchen beibehalten.

Für die Testung im Western Blot wurde als Protein das Zelllysat von COS-7-Zellen verwendet, die mit pcDNA3/CD8-PKD2 bzw. pBluescript (-) DNA transfiziert worden waren. Damit lässt sich feststellen, ob ein Antikörper spezifisch gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 gerichtet oder völlig unspezifisch ist.

Die Methode der Subklonierung führte lediglich bei Klon F1-47 zum gewünschten Ergebnis (siehe Tab. 3.7 und 3.8).

Darstellung des ELISA für Klon F1-47:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,05	0,075	0,115	1,992	0,121	0,087	0,109	0,082	0,097	0,098	0,065	0,061
B	0,061	0,073	0,062	0,074	0,107	0,079	0,094	0,101	0,098	0,208	0,062	0,071
C	0,067	1,669	1,768	0,078	0,111	0,075	0,073	0,063	0,079	0,065	0,056	0,062
D	0,054	0,069	0,066	0,082	0,066	0,071	0,061	0,064	0,084	0,06	0,065	0,063
E	0,069	1,319	0,058	0,063	0,095	0,115	1,12	0,082	0,069	0,07	0,077	0,063
F	0,062	0,065	0,073	0,076	0,111	0,084	0,066	0,074	0,096	0,066	0,063	0,068
G	0,058	0,074	0,09	0,103	0,101	0,082	0,047	0,085	2,184	0,089	0,064	0,055
H	1,911	0,1	0,067	0,091	0,089	0,118	0,071	0,06	0,128	0,06	0,073	0,065

Tab. 3.7: Testung von F1-47 mittels ELISA auf positive Subklone. Pro Vertiefung wurden 0,5 µg des zur Immunisierung verwendeten Proteinproduktes von pET28aΔT7/PKD2C aufgetragen. Als erster Antikörper diente jeweils unverdünnter Klonüberstand. Als zweiter Antikörper diente HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt). Bei den angegebenen Extinktionswerten handelt es sich um die reinen Messwerte ohne Abzug des Blindwertes. Die positiven Klone mit einer Extinktion > 1 sind in der Tabelle gelb, der Blindwert ist grau hinterlegt.

Darstellung des Western Blots für Klon F1-47:

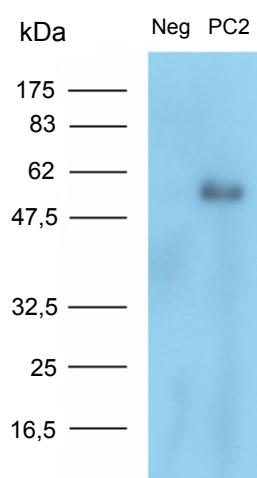


Abb. 3.11: Testung der Subklone von F1-47 mittels Western Blot. Je 20 µg Protein des Zelllysats von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2 (PC2) bzw. mit pBluescript (-) (Neg) transfiziert worden waren, wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper diente der Klonüberstand von Subklon F1-47 S1-3 mit einer Verdünnung von 1:10 in Blocklösung. Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt in Blocklösung) verwendet. Die Expositionszeit betrug 5 Minuten. Hierbei zeigte F1-47 S1-3 die spezifische Bande bei PC2 und keine in der Negativ-Kontrolle.

	Wachstum der Subklone	Anzahl der im ELISA positiven Subklone	Anzahl der im Western Blot positiven Subklone
F1-47	Mäßiges Wachstum	7 (davon 2 mit Western Blot getestet)	1 (Bezeichnung des Subklons F1-47 S1-3)

Tab. 3.8: Ergebnisdarstellung von Versuch 1 von F1-47.

Damit konnte F1-47 S1-3 für die zweite Subklonierung verwendet werden. Die Subklone von F1-17, F1-27, F1-48 und F2-9 zeigten in diesem Verfahren ausgeprägte Wachstumschwierigkeiten bzw. waren unspezifisch im Western Blot (Tab. 3.9).

	Wachstum der Subklone	Anzahl der im ELISA positiven Subklone	Anzahl der im Western Blot positiven Subklone
F1-17	Mäßiges Wachstum	3	-
F1-27	Starkes Wachstum	7	Unspezifische Banden
F1-48	Mäßiges Wachstum	-	-
F2-9	Kein Wachstum	-	-

Tab. 3.9: Ergebnisübersicht von Versuch 1 von F1-17, F1-27, F1-48 und F2-9.

Deshalb wurde in den weiteren Versuchen mit unterschiedlicher Ausgangsdichte der Klone, Medienmenge, verschiedenen Medienwechseln und unterschiedlichen Zellkonzentrationen/Vertiefungen experimentiert.

3.10.2 Zweiter Versuch

Hierfür wurden die Klone F1-17, F1-27 und F2-9 verwendet. Da Klon F1-48 ab Passage 3 keine Antikörper mehr produzierte und kaum Wachstum zeigte, musste dieser aufgegeben werden. Bei Versuch 2 wurden die Klone bis zu einer Dichte von 100.000 Zellen/ml gezüchtet und in je 100 µl frischem HT-Medium mit einer Konzentration von 1 Zelle/Vertiefung auf eine halbe 96-Loch-Platte und mit einer Konzentration von 1 Zelle/Vertiefung ebenfalls auf eine halbe 96-Loch-Platte ausplattiert. Am sechsten Tag wurden je Vertiefung 100 µl HT-Medium hinzugegeben.

Ergebnis des 2. Versuchs: Bei keinem der 3 Subklone waren am 10. Tag Klonformationen erkennbar.

3.10.3 Dritter Versuch

Die drei Klone wurden bis zu einer Dichte von ca. 300.000 Zellen/ml wachsen gelassen und in jeweils 100 µl frischem HT-Medium mit einer Konzentration von 1 Zelle/Vertiefung auf eine halbe 96-Loch-Platte und mit einer Konzentration von 10 Zellen/Vertiefung ebenfalls auf eine halbe 96-Loch-Platte ausplattiert. Nach 5 Tagen wurde das alte Medium abgesaugt und 200 µl frisches HT-Medium zugegeben. Am 9./10. Tag erfolgte wie üblich das Screening der Klone auf die Produktion von Antikörpern gegen das C-terminale Ende des menschlichen

Polycystin-2 Proteins mittels ELISA und anschließend die weitere Überprüfung der positiven Klone durch Western Blot zur endgültigen Bestätigung ihrer Spezifität.

Das Ergebnis der Testungen ist in Tab. 3.10 zusammengestellt.

	Wachstum der Subklone	Anzahl der im ELISA positiven Subklone	Anzahl der im Western Blot positiven Subklone
F1-17	Mäßiges Wachstum bis Tag 7, dann Absterben aller Subklone	0	0
F1-27	Starkes Wachstum	5	Unspezifische Banden
F2-9	Mäßiges Wachstum bis Tag 7, dann Absterben aller Subklone	0	0

Tab. 3.10: Ergebnisübersicht von Versuch 3.

3.10.4 Vierter Versuch

Hierbei war die Ausgangsdichte 350.000 – 450.000 Zellen/ml und die Klone wurden in je 50 µl frischen sowie 50 µl „gebrauchtem“ HT-Medium mit einer Konzentration von 1 Zelle/Vertiefung auf eine halbe 96-Loch-Platte sowie mit einer Konzentration von 5 Zellen/Vertiefung ebenfalls auf eine halbe 96-Loch-Platte ausplattiert. Dieses „gebrauchte“ HT-Medium wurde verwendet, da sich die Klone in einer höheren Zellkonzentration besser zu entwickeln schienen und man sich dadurch ein besseres Wachstum in der Subklonierung erhoffte. Nach fünf Tagen wurden je 100 µl frisches HT-Medium pro Vertiefung zugegeben.

Ergebnis des 4. Versuchs: Bei allen 3 Klonen waren nur sehr spärlich Klonformationen gewachsen, die alle um den 5. Tag nach der Subklonierung begannen abzusterben.

3.10.5 Fünfter Versuch

Hierfür wurden zunächst eingefrorene Zellen der drei Klone F1-17, F1-27 und F2-9 aus Passage 1 aufgetaut (siehe 2.2.15) und mittels ELISA und Western Blot auf Produktion von Antikörper gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 getestet. Die Absicht dahinter war, dass die Zellen aus einer früheren Passage das Subklonieren besser tolerieren würden als spätere Passagen und dass hier die Fähigkeit zur spezifischen Antikörperproduktion noch bestand, die eventuell bei nachfolgenden Passageschritten verloren ging. Dieses Mal wurde als Alternative zu dem HT-Medium Makrophagen verwendet. Diese wurden 2 Tage vor der geplanten Subklonierung gewonnen und mit je 75 µl 90% RPMI 1640/1% Penicillin/Streptomycin-Stammlösung/10% FCS auf jeweils zwei 96-Loch-Platten pro Maus ausplattiert.

Die Klone wurden bis zu einer Ausgangsdichte von 350.000 – 400.000 Zellen/ml kultiviert und in je 125 µl HT-Medium mit einer Konzentration von 1 Zelle/Vertiefung sowie 5 Zellen/Vertiefung auf jeweils eine 96-Loch-Platte mit den Makrophagen ausplattiert.

Ergebnis des fünften Versuchs: Bei allen drei Klonen waren zahlreiche Subklone zu erkennen, die am 9. Tag nach dem Subklonieren mittels ELISA getestet werden konnten. Hier erwiesen sich fast alle Subklone als positiv. Nur stark wachsenden Subklonen wurde auch mittels Western Blot getestet.

Den Western Blot für die erste Subklonierung der Klone F1-17, F1-27 und F2-9 zeigt Abb. 3.13. Wie man deutlich erkennen kann, lieferten alle getesteten Subklone von Klon F1-27 unspezifische Banden und wurden deshalb aufgegeben. Bei Klon F1-27 fanden sich bei fünf von fünf getesteten Subklonen Banden bei dem Zelllysat von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2 transfiziert waren. Ähnlich verhielt es sich mit fünf der sechs getesteten Subklone von Klon F2-9.

Nach der ersten Subklonierung konnten die Subklone auf eine 24-Loch-Platte und anschließend in einer 25 cm² Zellkulturflasche in HT-Medium ohne Makrophagen kultiviert werden. Dies erfolgte, indem bei der Umsetzung oder beim Splitten der Subklone ausschließlich HT-Medium hinzugegeben wurde.

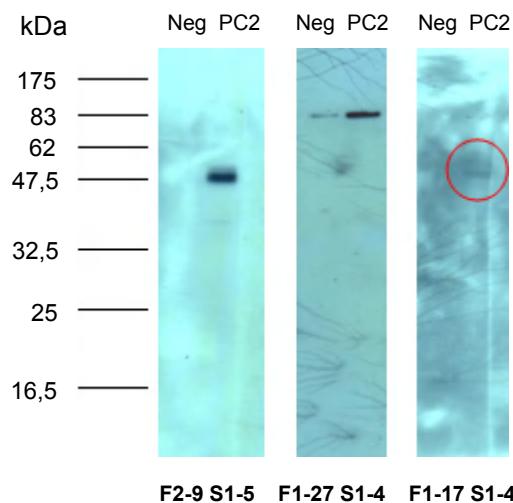


Abb. 3.12: Testung der Subklone von F1-17, F1-27 und F2-9 mittels Western Blot. Je 20 µg Protein des Zelllysats von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2 (PC2) bzw. mit pBluescript (-) (Neg) transfiziert worden waren, wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper diente der Überstand der Subklone F2-9 S1-5, F1-27 S1-4 und F1-17 S1-4 mit einer Verdünnung von 1:10 in Blocklösung. Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt in Blocklösung) verwendet. Die Expositionszeit betrug 20 Minuten. Hierbei zeigten sich bei F2-9 S1-5 sowie sehr schwach bei F1-17 S1-4 (mit rotem Kreis markiert) eine spezifische Bande bei PC2 und keine in der Negativ-Kontrolle. Der Subklon F1-27 S1-4 lieferte ein unspezifische Bande sowohl in PC2 als auch in Neg und wurde deshalb aufgegeben.

3.11 Zweite Subklonierung

- Subklon F1-47 S1-3:
 - Subklon F1-17 S1-4 }
 - Subklon F2-9 S1-5
- Das zweite Subklonieren wurde nach dem gleichen Schema wie der erste Versuch der ersten Subklonierung durchgeführt.
Das zweite Subklonieren wurde nach dem gleichen Schema wie der fünfte Versuch der ersten Subklonierung durchgeführt.

Die Subklone aus der zweiten Subklonierung wurden wie üblich zunächst mittels ELISA und ausgewählte Subklone auch mittels Western Blot getestet. Es zeigte sich, dass alle acht getesteten Subklone von F1-47 S1-3 im Western Blot positive Ergebnisse lieferten und Antikörper gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 produzierten. Ähnlich verhielt es sich bei drei von drei getesteten weiteren Subklonen des Subklons F2-9 S1-5. Dies ließ darauf schließen, dass bereits die erste Subklonierung zu einem Klon mit monoklonaler Antikörperproduktion geführt hatte, da ansonsten auch unspezifische Subklone auftreten müssten.

Für die weiteren Versuche wurden von jedem Subklon der ersten Subklonierung jeweils zwei Subklone der zweiten Subklonierung weiter kultiviert, um bei einem eventuellen Wachstumsstopp, Nachlassen der Antikörperproduktion oder im Fall einer Kontaminierung weiterhin zumindest einen Subklon des Ausgangsklons zu besitzen.

Bei Subklon F1-17 S1-4 zeigten sich im durchgeführten Western Blot keine Banden oder waren aufgrund des starken Hintergrundes kaum zu erkennen, so dass der Klon aufgegeben wurde.

Als Beispiel sei der ELISA für die zweite Subklonierung von F1-47 S1-3 in Tab. 3.11 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,821	0,092	0,118	0,491	0,181	2,345	2,896	1,266	3,434	3,127	0,176	3,355
B	3,398	3,293	3,274	3,376	3,544	3,42	3,41	0,104	3,453	1,568	3,38	0,14
C	3,619	3,485	3,312	3,569	0,095	0,092	3,398	3,029	1,191	1,112	0,135	3,356
D	0,912	3,034	3,2	3,189	3,468	2,5	0,163	3,46	0,55	0,127	3,348	0,098
E	0,074	2,632	2,122	3,393	1,444	0,247	0,114	3,503	0,116	3,065	0,105	0,633
F	0,148	0,085	3,324	3,294	3,292	3,454	2,497	3,488	3,073	3,406	0,088	0,084
G	3,315	0,102	0,103	0,211	3,32	2,367	1,782	0,098	0,099	0,626	0,085	3,281
H	3,206	0,205	3,418	3,311	3,504	2,006	2,818	3,714	3,203	3,41	1,351	3,206

Tab. 3.11: Screening auf positive Subklone mittels ELISA. Pro Vertiefung wurden 0,5 µg des zur Immunisierung verwendeten Proteins aufgetragen. Als erster Antikörper diente jeweils unverdünnter Überstand der Subklone von F1-47 S1-3. Als zweiter Antikörper diente HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt). Als Negativ-Kontrolle wurde Kulturmedium, als Positiv-Kontrolle Überstand von F1-47 verwendet. Hierbei zeigten sich eine Vielzahl von deutlich positiven Subklonen mit einer Extinktion >1. Bei den angegebenen Extinktionswerten handelt es sich um die reinen Messwerte ohne Abzug des Blindwertes.

Bedeutung der farblich hinterlegten Felder:



Positive Subklone mit Extinktion > 1

Negativ-Kontrolle: Kulturmedium

Positiv-Kontrolle: F1-47

Als Beispiel ist nachstehend der Western Blot für die zweite Subklonierung von F1-47 S1-3 in Abb. 3.13 wiedergegeben.

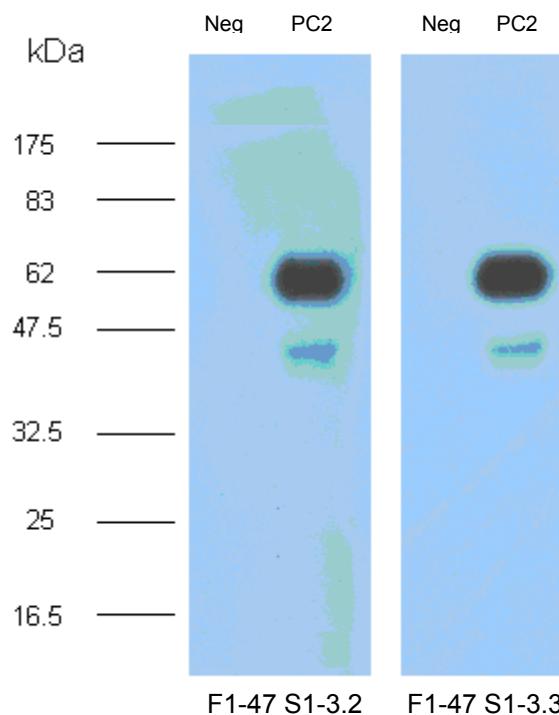


Abb. 3.13: Testung der Subklone von F1-47 S1-3 mittels Western Blot. Je 20 µg Protein des Zelllysats von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2 (PC2) bzw. mit pBluescript (-) (Neg) transfiziert worden waren, wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper diente der Überstand der Subklone F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3 mit einer Verdünnung von 1:10 in Blocklösung. Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt in Blocklösung) verwendet. Die Expositionszeit betrug 5 Minuten. Hierbei zeigten sich bei beiden Subklonen eine deutliche, spezifische Bande bei PC2 und keine in der Negativ-Kontrolle.

3.12 Mediumwechsel

Da die Subklone nach dem zweiten Subklonieren in dem HT-Medium gut wuchsen und alle drei Tage 1:5 gesplittet werden konnten, wurde ein Medienwechsel auf Standardmedium aus 90% RPMI 1640 und 10% FCS angestrebt.

Dazu wurden die im HT-Medium wachsenden Klone 1:3 in einer Lösung aus 80% RPMI 1640 und 20% FCS passagiert. Nach zwei Tagen konnten diese Klone wiederum 1:3 in das Standardmedium gesplittet werden.

Die Subklone F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3 zeigten im Standardmedium gutes Wachstum, so dass sie alle drei Tage 1:5 gesplittet werden konnten. Die Subklone F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4 hingegen fielen im Standardmedium durch extrem langsames Wachstum auf, so dass sie zwar überlebten, aber ein Splitten kaum möglich war. Aus diesem Grund wurden sie weiterhin in einem Medium aus 80% RPMI 1640 und 20% FCS kultiviert und konnten darin alle drei Tage 1:3 gesplittet werden.

3.13 Endergebnisse

Nachdem im Laufe der Versuche und beim Subklonieren immer wieder Klone aufgehört hatten, Antikörper zu produzieren oder unspezifische Banden lieferten, gab es nach der zweiten Subklonierung lediglich zwei im Western Blot positive Klone, die abermals sowohl im Western Blot als auch in Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation getestet wurden:

Immunisierung	Klon	Subklone nach 2. Subklonierung
Maus 420	F1-47	F1-47 S1-3.2 F1-47 S1-3.3
Maus 421	F2-9	F2-9 S1-5.2 F2-9 S1-5.4

Tab. 3.12: Ergebnisübersicht der Subklone.

3.14 Klon F1-47 mit den Subklonen F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3

Bei F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3 handelt es sich um zwei monoklonale Maus-Antikörper, die gegen Polycystin-2 gerichtet sind und bei -20°C gelagert werden können. Zu den einzelnen Testungen in Folgendem:

3.14.1 ELISA

Da die Klone bisher immer mittels ELISA positiv auf die gewünschte Antikörperproduktion getestet worden waren, konnte davon ausgegangen werden, dass sie auch nach der zweiten Subklonierung positiv getestet werden konnten. Dies bestätigte sich beispielsweise in diesem direkten ELISA (Tab. 3.13).

	Überstand von Klon	Extinktion
Positiv-Kontrolle	F1-47	1,821
	F1-47 S1-3.2	3,274
	F1-47 S1-3.3	3,324
Negativ-Kontrolle	Medium	0,084

Tab. 3.13: Testung der monoklonalen Antikörper der Subklone von F1-47 mittels ELISA. Pro Vertiefung wurden 0,5 µg des zur Immunisierung verwendeten Proteins aufgetragen. Als erster Antikörper diente jeweils unverdünnter Überstand von F1-47, F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3. Als zweiter Antikörper diente HRP anti-Maus IgG (1:10.000 verdünnt). Als Negativ-Kontrolle wurde Medium verwendet. Hierbei zeigten sich bei den Subklonen deutlich höhere Extinktionswerte im Vergleich zum Ausgangsklon. Bei den angegebenen Extinktionswerten handelt es sich um die reinen Messwerte ohne Abzug des Blindwertes.

3.14.2 Immunfluoreszenz

Hierfür wurden COS-7-Zellen mittels der DEAE-Dextran-Technik mit pcDNA3/CD8-PKD2C transfiziert. Die Fixierung erfolgte mit Bouin-Reagenz oder mit 4%igem PFA. Als erster Antikörper wurden die Subklone F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3 in einer Verdünnung

von 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000, 1:3.000, 1:10.000 sowie 1:30.000 in 2% BSA / 1x PBS verwendet, als zweiter Antikörper diente Cy3 anti-Maus IgG in einer Verdünnung von 1:400 in 2% BSA / 1x PBS. Als Positiv-Kontrolle diente OKT 8 in einer Verdünnung von 1:30 in 2% BSA / 1x PBS.

Beispiel: Verdünnungsreihe von Subklon F1-47 S1-3.2, Fixierung in Bouin mit einer Belichtung von 200 ms.

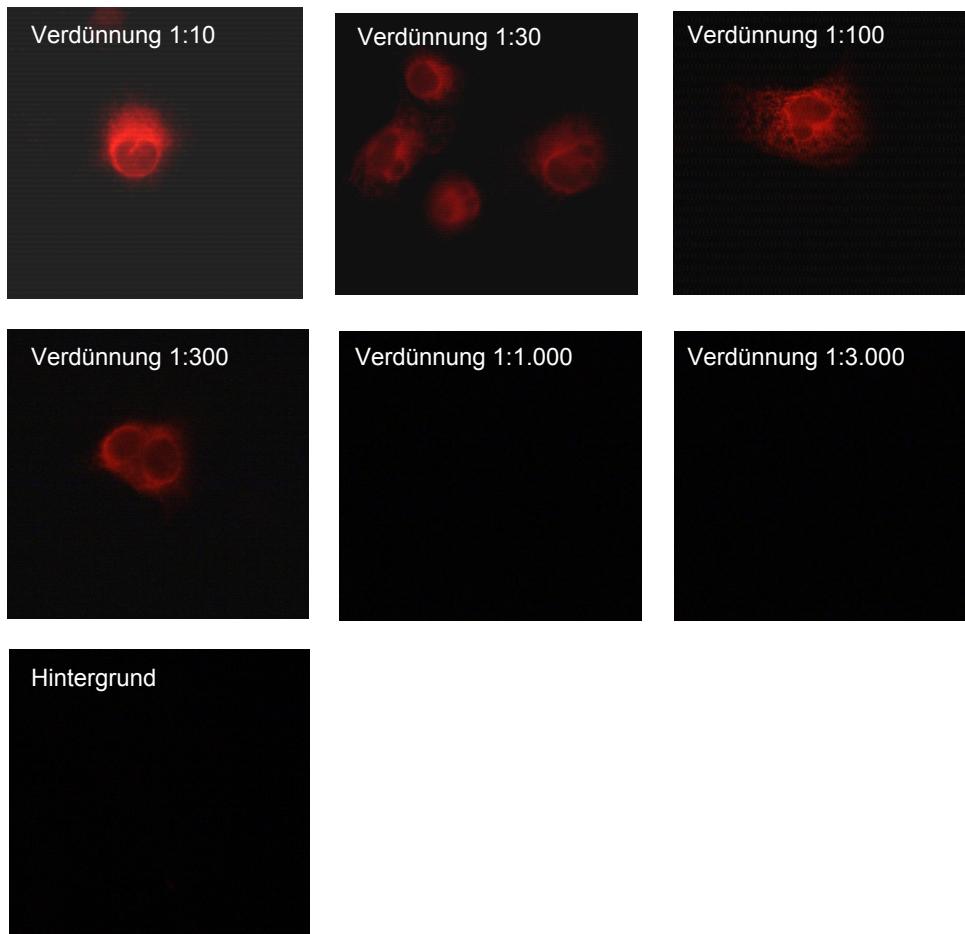


Abb. 3.14: Verdünnungsreihe des Subklons F1-47 S1-3.2 in der Immunfluoreszenz. Mit pcDNA3/CD8-PKD2C transfizierte COS-7-Zellen bzw. zur Bestimmung des Hintergrunds mit pBluescript (-) transfizierte COS-7-Zellen (Hintergrund) wurden mit Bouin-Reagenz fixiert. Als erster Antikörper diente der Überstand des Subklons F1-47 S1-3.2 in den Verdünnungen 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 und 1:3.000. Als zweiter Antikörper diente Cy3 anti-Maus IgG (1:400 verdünnt in 2% BSA / 1x PBS). Hierbei konnte bis zu einer Verdünnung von 1:300 das Protein im endoplasmatischen Retikulum dargestellt werden.

Die Subklone von F1-47 funktionieren in der Immunfluoreszenz bis einschließlich einer Verdünnung von 1:300 verlässlich. Die Fixierung mit 4% PFA ergab keine Vorteile im Vergleich zur Fixierung mit Bouin-Reagenz.

3.14.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde wie unter 2.2.26 beschrieben durchgeführt. Als Protein wurde Zelllysat von COS-7-Zellen verwendet, die mit pcDNA3/CD8-PKD2C transfiziert wurden. Als Positiv-Kontrolle diente OKT8, ein gegen CD8 gerichteter Maus-Antikörper. Als Negativ-Kontrolle wurde der Maus-Antikörper 12CA5 verwendet, der gegen das HA-Epitop gerichtet ist. Das Ergebnis der Immunpräzipitation ist in Abb. 3.15 dargestellt.

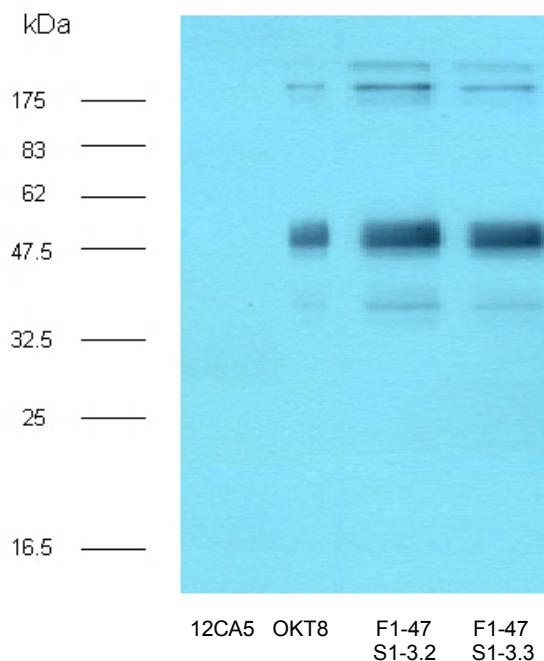


Abb. 3.15: Testung der Subklone F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3 mittels Immunpräzipitation. Je 12-15 µl mit Protein G beschichtete Beads wurden zusammen mit 250 µg Zelllysat von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2C transfiziert wurden, sowie 50 µl des zu testenden Antikörpers bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und das Pellet in 100 µl SDS-Proben-Puffer resuspendiert. Je 25 µl des resuspendierten Pellets (12CA5, OKT8, F1-47 S1-3.2, F1-47 S1-3.3) wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper diente YCC2, ein polyklonaler Antikörper gegen Polycystin-2 (1:4.000 in Blocklösung verdünnt). Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Kaninchen IgG (1:20.000 in Blocklösung verdünnt) verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente OKT8, ein gegen CD8 gerichteter Maus-Antikörper, und als Negativ-Kontrolle wurde der Maus-Antikörper 12CA5 verwendet, der gegen das HA-Epitop gerichtet ist. Die Expositionszeit betrug 1 Minute. Hierbei zeigten sich sowohl in der Positiv-Kontrolle (OKT8) sowie bei beiden Subklonen (F1-47 S1-3.2, F1-47 S1-3.3) deutliche Banden.

3.14.4 Western Blot

Die Überstände der Subklone F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3 wurden in den Verdünnungen 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 und 1:3.000 (in Blocklösung) getestet. Als Protein wurde Zelllysat von COS-7-Zellen verwendet, die mit pcDNA3/CD8-PKD2C transfiziert wurden. Als Negativ-Kontrolle diente Zelllysat von COS-7-Zellen, die mit pBluescript (-) transfiziert wurden.

Beispiel: Verdünnungsreihe von Subklon F1-47 S1-3.2 (Abb. 3.16).

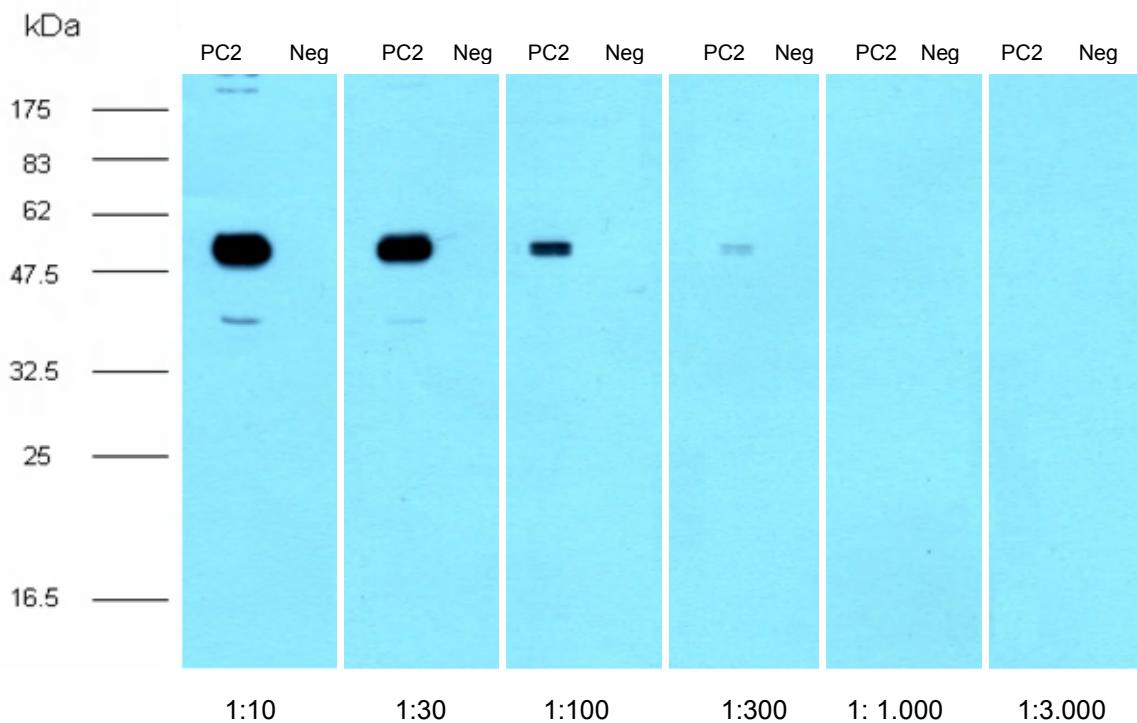


Abb. 3.16: Verdünnungsreihe des Subklons F1-47 S1-3.2 im Western Blot. Je 20 µg Protein des Zelllysats von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2C (PC2) bzw. mit pBluescript (-) (Neg) transfiziert worden waren, wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper diente der Überstand des Subklons F1-47 S1-3.2 in den Verdünnungen 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 und 1:3.000. Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Maus IgG (1:10.000 in Blocklösung verdünnt) verwendet. Die Expositionszeit betrug 60 Minuten. Hierbei zeigte sich bis zu einer Verdünnung von 1:300 eine deutliche, spezifische Bande bei PC2 und keine in der Negativ-Kontrolle.

Subklon F1-47 S1-3.2 produziert monoklonale Antikörper, die im Western Blot bei Protein aus lysierten Zellen bis zu einer Verdünnung von 1:300 zuverlässig funktionieren. Da es sich hierbei um Lysat aus transfizierten Zellen handelte, dürfte die mögliche Verdünnung bei aufgereinigtem Protein wesentlich höher sein.

3.15 Klon F2-9 mit den Subklonen F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4

Bei F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4 handelt es sich um zwei Klone mit monoklonaler Maus-Antikörperproduktion gegen das C-terminale Ende des menschlichen Polycystin-2 Proteins. Die Antikörper müssen bei +4°C gelagert werden, da Lagerung bei -20°C zum Funktionsverlust führte. Zu den einzelnen Testungen im Folgenden:

3.15.1 ELISA

Da bereits der Ausgangsklon F2-9 oftmals Werte im oberen Messbereich (Extinktion >2,8) lieferte, war nach der 2. Subklonierung kein relevanter Unterschied erkennbar.

3.15.2 Immunfluoreszenz

Wie bereits unter 3.14.2 beschrieben, wurde hierfür genauso wie bei den Antikörpern F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.2 die COS-7-Zellen unter Verwendung der DEAE-Dextran-Technik mit pcDNA3/CD8-PKD2 transfiziert. Die Fixierung erfolgte mit Bouin-Reagenz oder mit 4% PFA. Als erster Antikörper wurden die Subklone F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4 in einer Verdünnung von 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000, 1:3.000, 1:10.000 und 1:30.000 (in 2% BSA / 1x PBS verdünnt) verwendet. Als zweiter Antikörper diente Cy-3 anti-Maus IgG (1:400 in 2% BSA / 1x PBS verdünnt). Zur Positiv-Kontrolle diente OKT 8 (1:30 in 2% BSA / 1x PBS verdünnt).

Beispiel: Verdünnungsreihe von Subklon F2-9 S1-5.4, Fixierung in Bouin, mit einer Belichtung von 200 ms.

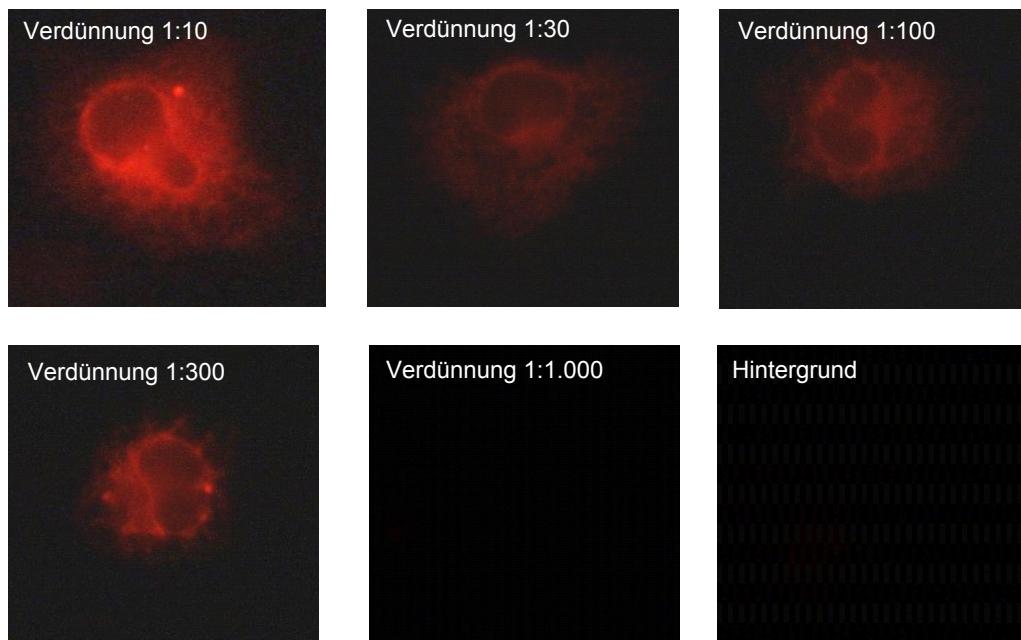


Abb. 3.17: Verdünnungsreihe des Subklons F2-9 S1-5.4 in der Immunfluoreszenz. Mit pcDNA3/CD8-PKD2C transfizierte COS-7-Zellen bzw. zur Bestimmung des Hintergrunds mit pBluescript (-) transfizierte COS-7-Zellen (Hintergrund) wurden mit Bouin-Reagenz fixiert. Als erster Antikörper diente der Überstand des Subklons F2-9 S1-5.4 in den Verdünnungen 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 und 1:3.000. Als zweiter Antikörper diente Cy-3 anti-Maus IgG (1:400 in 2% BSA / 1x PBS verdünnt). Hierbei konnte bis zu einer Verdünnung von 1:300 das Protein im endoplasmatischen Retikulum dargestellt werden.

Die Überstände der Subklone F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4 lieferten bis zu einer Verdünnung von 1:300 gute Ergebnisse. Es bestand ebenfalls kein relevanter Unterschied zwischen der Qualität der Zellen mit Fixierung mittels Bouin-Reagenz oder 4% PFA.

3.15.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde wie unter 2.2.26 beschrieben durchgeführt. Als Protein wurde Zelllysat von COS-7-Zellen verwendet, die mit pcDNA3/CD8-PKD2C transfiziert worden

waren. Als Positiv-Kontrolle diente OKT8, ein gegen CD8 gerichteter Maus-Antikörper, als Negativ-Kontrolle wurde der Maus-Antikörper 12CA5 verwendet, der gegen das HA-Epitop gerichtet ist.

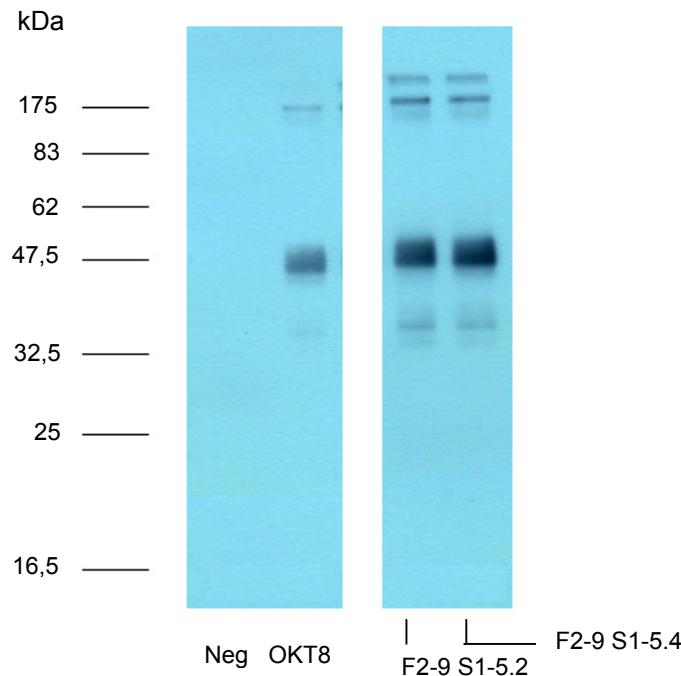


Abb. 3.18: Testung der Subklone F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4 mittels Immunpräzipitation. Je 12-15 µl mit Protein G beschichtete Beads wurden zusammen mit 250 µg Zellysat von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2C transfiziert wurden, sowie 50 µl des zu testenden Antikörpers bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und das Pellet in 100 µl SDS-Poben-Puffer resuspendiert. Je 25 µl des resuspendierten Pellets (12CA5, OKT8, F2-9 S1-5.2, F2-9 S1-5.4) wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper diente YCC2, ein polyklonaler Antikörper gegen Polycystin-2 (1:4.000 in Blocklösung verdünnt). Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Kaninchen IgG (1:20.000 in Blocklösung verdünnt) verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente OKT8, ein gegen CD8 gerichteter Maus-Antikörper und als Negativ-Kontrolle (Neg) wurde der Maus-Antikörper 12CA5 verwendet, der gegen das HA-Epitop gerichtet ist. Die Expositionszeit betrug 1 Minute. Hierbei zeigten sich sowohl in der Positiv-Kontrolle (OKT8) sowie bei beiden Subklonen (F2-9 S1-5.2, F2-9 S1-5.4) deutliche Banden.

3.15.4 Western Blot

Die Überstände der Subklone F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4 wurden in den Verdünnungen 1:10, 1:30, 1:100, 1:100, 1:300, 1:1.000 und 1:3.000 getestet. Als Protein wurde Lysat von COS-7-Zellen verwendet, die mit pcDNA3/CD8-PKD2C transfiziert wurden. Als Negativ-Kontrolle diente Lysat von COS-7-Zellen, die mit pBluescript (-) transfiziert wurden.

Der Subklon F2-9 S1-5.4 produzierte monoklonale Antikörper, die im Western Blot bei Protein aus lysierten Zellen bis zu einer Verdünnung von 1:1.000 zuverlässig funktionieren. Da es sich hierbei um Zellysat aus transfizierten Zellen handelte, dürfte die mögliche Verdünnung bei aufgereinigtem Protein wesentlich höher anzunehmen sein.

Beispiel: Verdünnungsreihe von Subklon F2-9 S1-5.4 (Abb. 3.19):

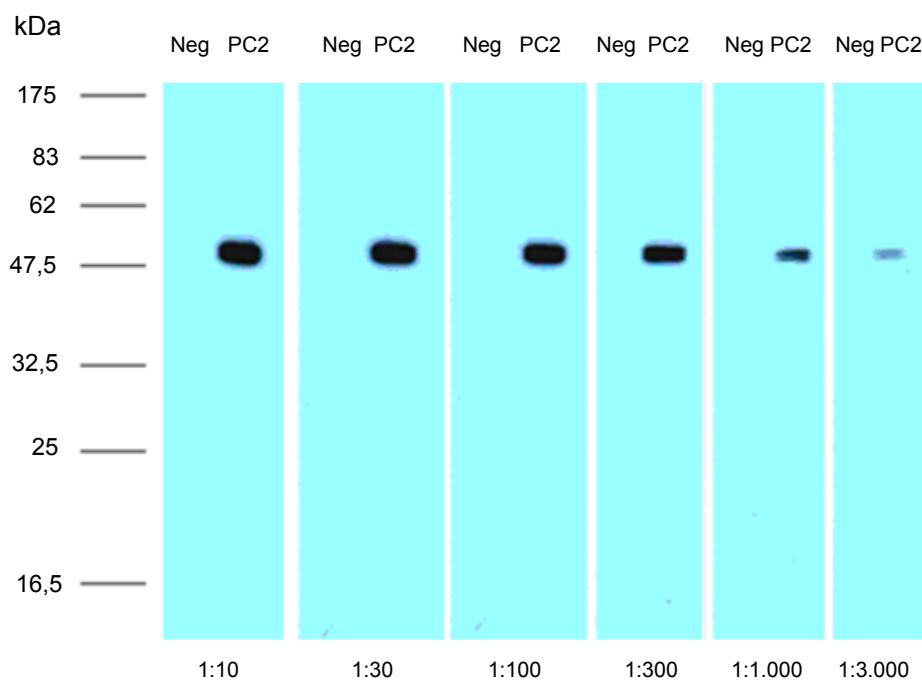


Abb. 3.19: Verdünnungsreihe des Subklons F2-9 S1-5.4 im Western Blot. Je 20 µg Protein des Zelllysats von COS-7-Zellen, die mit pcDNA3/CD8-PKD2C (PC2) bzw. mit pBluescript (-) (Neg) transfiziert worden waren, wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als erster Antikörper diente der Überstand des Subklons F2-9 S1-5.4 in den Verdünnungen 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 und 1:3.000. Als zweiter Antikörper wurde HRP anti-Maus IgG (1:10.000 in Blocklösung verdünnt) verwendet. Die Expositionszeit betrug 60 Minuten. Hierbei zeigte sich bis zu einer Verdünnung von 1:300 eine deutliche, spezifische Bande bei PC2 und keine in der Negativ-Kontrolle.

4 Diskussion

4.1 Vorbemerkungen

Seit Entdeckung des Genprodukts von *PKD2*, Polycystin-2, wurde über die Herstellung zahlreicher polyklonaler Antikörper berichtet. Bereits 1999 wurde von der Forschergruppe um Stefan Somlo die Herstellung der polyklonalen Antikörper YCC2 und YCB9 [Cai 1999] sowie zeitgleich von der unabhängigen Forschergruppe um Albert C. M. Ong die Herstellung des polyklonalen Antikörpers p30 berichtet [Ong 1999]. Aber auch aktuell spielen Antikörper weiterhin eine wichtige Rolle bei Erforschung des Polycystin-2 Proteins, was die Entwicklung des anti-Zebrafisch PC2 Antikörpers im Jahr 2006 [Obara 2006] zeigt.

Allerdings zeigte sich, dass trotz der Vielzahl der gegen Polycystin-2 gerichteten Antikörper bisher lediglich ein monoklonaler Antikörper vorhanden war. Dies mag möglicherweise daran liegen, dass sich die Herstellung polyklonaler Antikörper wesentlich schneller und auch kosten-günstiger gestaltet. Dem gegenüber steht jedoch, dass bei einem polyklonalen Antikörper immer mehrere Epitope des Antigens, also von PC2, erkannt werden und keine Aussage über ein spezifisches Epitop getroffen werden kann, während bei einem monoklonalen Antikörper lediglich ein spezifisches Epitop erkannt wird.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, monoklonale Antikörper gegen Polycystin-2 herzustellen, die in möglichst vielen Versuchsmethoden anwendbar wären. Als Angriffspunkt diente das intrazelluläre C-terminale Ende von PC2, das eine 34 Aminosäuren umfassende Domäne aufweist, das für die Lokalisation von PC2 im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich zu sein scheint [Cai 1999]. Darüber hinaus weist diese Domäne mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen auf und kann die PACS Proteine binden, die für den retrograden Transport und den Verbleib von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich sind [Kottgen 2005, Wan 1998]. Dabei wurde auf die grundlegenden Arbeiten von Georges J. F. Köhler und César Milstein zurückgegriffen, die für ihre Verdienste um die Erforschung und die Entwicklung der Technik der monoklonalen Antikörperherstellung 1984 den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin verliehen bekamen.

4.2 Grundlagen für die Antikörperherstellung und Testung

4.2.1 Proteine

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Proteine verwendet, die einerseits zur Immunisierung der Mäuse, andererseits zur Testung der Hybridomzellklone verwendet wurden.

Zur Immunisierungen wurde das Proteinprodukt von pET28aΔT7/PKD2C verwendet. Da der Vektor pET28a für rekombinante Proteine mit einem N-terminalen Histidin-Schwanz kodiert, konnte das Protein mittels Ni²⁺-Säule aufgereinigt werden. Die Induktion erfolgte in Rosetta, einem von BL21 (DE3) abgeleiteten Bakterienstamm, der die Ausbeute von eukaryontischen Proteinen erhöht, die Codons aufweisen, die in normalen *E. coli* Stämmen selten vorkommen. So enthält der Rosetta-Stamm das pRARE-Plasmid, das für die tRNA der Codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA kodiert. Durch Verwendung dieses speziellen

Bakterienstammes konnte die hohe Proteinausbeute von 6 mg pro 500 ml Kulturansatz erreicht werden, die aufgrund des hohen Proteinbedarfs z.B. durch Immunisierung und Testung der Hybridomzellklone, auch notwendig war.

Ein weiteres Protein, das vor allem zur Testung im ELISA verwendet wurde, war das von pGEX-4T-1/PKD2C kodierte GST-Fusionsprotein. Dieses enthält die 26 kDa umfassende Glutathion S-Transferase (GST) und konnte dadurch mittels Glutathion-Säule aufgereinigt werden. Zunächst wurde pGEX-4T-1/PKD2C in BL21 induziert, was jedoch lediglich zu einer Proteinausbeute von 0,3 mg pro 500 ml Ansatz führte. Da für die Testungen der Zellklone um ein Vielfaches höhere Proteinmengen notwendig waren, wurde pGEX-4T-1/PKD2C in Rosetta transfiziert. Dadurch konnte eine wesentlich höhere Proteinausbeute von ~7 mg erreicht werden.

Um sicherzustellen, dass die Zellklone Antikörper gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 produzierten und nicht gegen den Histidin-Schwanz, wurde ein weiteres Protein benötigt, das einen Histidin-Schwanz, aber keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit PC2 aufwies. Hierfür wurde das durch pET21b/CIP1 (116/493) kodierte Protein verwendet. Dieses besitzt ein N-terminales T7-Epitop sowie den notwendigen C-terminalen Histidin-Schwanz, mittels dessen es über eine Ni²⁺-Säule aufgereinigt werden kann. Die Induktion erfolgte in BL21, führte aber lediglich zu einer Proteinausbeute von 0,5 mg pro 500 ml Ansatz. Dies konnte jedoch anders als bei dem GST-Fusionsprotein toleriert werden, da lediglich eine Versuchsreihe mit diesem Protein erfolgte.

4.2.2 DNA und Zelltransfektion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirksamkeit der von den Zellklonen produzierten Antikörper nicht nur an in Bakterien synthetisiertem und anschließend aufgereinigtem Protein, sondern auch an Zelllysat getestet werden. Hierfür wurde als Plasmid pcDNA3/CD8-PKD2 verwendet, dieses kodiert für das C-terminale Ende von Polycystin-2, das an den Lymphozytenmarker CD8 gekoppelt ist. Somit kann PC2 indirekt durch den gegen CD8 gerichteten Antikörper OKT8, der in den Versuchen als Positiv-Kontrolle verwendet wurde, nachgewiesen werden.

Bei der für die Transfektionen verwendeten COS-7 Zelllinie handelte es sich um eine 1981 publizierte, etablierte Zelllinie aus dem Nierengewebe von Grünen Meerkatzen, die stabil das sog. T-Antigen des SV 40-Virus produziert. Dieses erlaubt die extrachromosomal Replikation von Plasmiden wie pcDNA3, die den Replikationsursprung von SV40 tragen, und damit eine hohe Syntheserate des exogenen Proteins ermöglichen.

4.3 Immunisierung der Mäuse und Zellfusion

Für die Immunisierung wurden, ähnlich den Versuchen von Georges J. F. Köhler und César Milstein, BALB/c-Mäuse verwendet [Köhler 1976]. Dies ist ein von Halsey Bagg 1920 erstmals gezüchteter Albino-Mäusestamm (B: Bagg, ALB:albino, c: Genotyp am Farblocus: c/c), der sich durch Neigung zur Bildung von Plasmazytomen nach Injektion von Mineralölen auszeichnet.

Die Immunisierung der 6-8 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäuse erfolgte dreimal subkutan im Abstand von 3 Wochen mit 100 µg Protein in Verbindung mit dem Adjuvans Titermax Classic, sowie nach weiteren 3 Wochen zuletzt einmal intraperitoneal ohne Adjuvans. Titermax Classic wurde anstelle des von Georges J. F. Köhler und César Milstein verwendeten Freudschen Adjuvans verwendet. Sein Vorteil gegenüber dem Freudschen Adjuvans liegt darin, dass es keine inaktivierten *Mykobacterium tuberkulosis* Erreger enthält und die Mäuse weniger belastet.

Durch die insgesamt vier Injektionen erfolgte die Immunisierung wesentlich häufiger als bei Georges J. F. Köhler und César Milstein, die lediglich zwei Injektionen im Abstand von einem Monat durchführten [Köhler 1976]. Dadurch sollte eine möglichst starke Immunisierung und hohe Antikörperproduktion erreicht werden, die mittels ELISA des Mausserums bestätigt wurde, bevor die Mäuse für die Fusionen verwendet wurden. Zusätzlich wurde mittels ELISA getestet, ob eine Antikörperproduktion der Mäuse gegenüber dem Histidin-Schwanz des zur Immunisierung verwendeten Proteins vorlag, um eventuell vor allem gegen den Histidin-Schwanz immunisierte Mäuse nicht zur Fusion zu verwenden. Allerdings zeigte sich bei keiner der sechs Mäuse bei der Testung des Mäuseserums eine relevante Antikörperbildung gegen den Histidin-Schwanz.

Ähnlich historischem Vorbild wurden zwei Mäuse fünf Tage nach dem letzten Boost getötet, die Milz entfernt und die Lymphozyten mit den Myelomzellen in einem Verhältnis von 1:3 (Milzzellen:Myelomzellen) fusioniert [Köhler 1976]. Die verwendete Myelomzelllinie X63Ag8.6.5.3 ähnelt der von Köhler und Milstein verwendeten P3-X67Ag8 Zelllinie, die sich durch ein Fehlen des Enzyms Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HGPRT) auszeichnet. Als Selektionsmedium wurde ebenfalls HAT-Medium verwendet, das Hypoxanthin und Thymidin enthält, worin nur Zellen, die über die HGPRT verfügen, teilungs- und überlebensfähig sind. Da zwar Lymphozyten über HGPRT verfügen, aber nicht teilungs- bzw. längere Zeit in Kultur überlebensfähig sind, wurde durch das Selektionsmedium sichergestellt, dass nur fusionierte Zellen weiter kultiviert wurden.

Köhler und Milstein verwendeten für die Zellfusion zunächst das Sendai Virus [Köhler 1976]. Diese Methode scheint jedoch hauptsächlich bei IgM-produzierenden Hybridomzellklonen zu einem befriedigendem Ergebnis zu führen, wie Fazekas et. al. 1980 zeigen konnten. So waren bei 174 erfolgreich mit Sendai Virus fusionierten Hybridomzellklonen 148 IgM-produzierende Klone, was 85% der Klonausbeute ausmachte, während nur 13,8 % der Klone IgG produzierten. Serologische Untersuchungen der Mäuse zeigten jedoch, dass nur 1,7% der IgM-Fraktion spezifisch gegen das zur Immunisierung verwendete Agens waren. Somit bestand keine Relation der IgM-produzierenden Hybridomzellklone mit dem serologischen Immunstatus der Mäuse. Jedoch konnte diese Relation für Polyethylenglykol nachgewiesen werden [De StGroth 1980], so dass in dieser Arbeit Polyethylenglykol zur Zellfusion verwendet wurde.

Die Zellen wurden nach der Fusion auf zehn 96-Loch-Platten ausplattiert, das sich als wesentlich zu dicht erwies, da in > 90% der Vertiefungen Klonformationen und davon in ca. 30% der Fälle zwei oder mehr Klonformationen vorhanden waren.

4.4 Testung auf gegen Polycystin-2 gerichtete Antikörper

Am 8. bzw. 9. Tag nach erfolgter Fusion wurden die Klonformationen hinsichtlich ihrer Antikörperproduktion gegen Polycystin-2 mittels ELISA getestet. Als Protein für den ELISA diente das Proteinprodukt von pET28a Δ T7/PKD2C, das bereits zur Immunisierung der Mäuse verwendet worden war. Hierbei zeigten sich bei der ersten Fusion 310 und bei der zweiten Fusion 98 im ELISA positiv auf eine Antikörperproduktion gegen das C-terminale Ende von menschlichem Polycystin-2 getestete Klone. Hiermit lag die Ausbeute an den gesuchten Antikörper produzierenden Klonen mit über 20% weitaus höher als bei der von Georges J. F. Köhler und César Milstein beschriebenen Klonausbeute von 33 positiv getesteten Klonen (~3%) von insgesamt 1.086 mikroskopisch nachgewiesenen Klonen [Köhler 1975].

Dieser Unterschied in der Klonausbeute mag möglicherweise einerseits an der modifizierten Immunisierungsmethode, am unterschiedlichen immunisierenden Potential des verwendeten Proteins bzw. an der unterschiedlichen Methode der Testung auf Antikörper liegen. Eine weitere mögliche Ursache könnte die hohe Dichte der Klonformationen sein, so dass in ca. 30% der Vertiefungen mehrere Klone vorlagen und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit bestand, dass der Überstand dieser Vertiefungen im ELISA später positiv getestet wurde.

Um von vornherein die Anzahl der Klone etwas einzudämmen, wurden nur diejenigen verwendet, die Werte > 1,5 (erste Fusion) bzw. Werte > 1,2 (zweite Fusion) lieferten. Somit blieben 48 Klone aus der ersten Fusion und 44 aus der zweiten Fusion, die weiter getestet wurden.

Zwar war bereits bei der Immunisierungskontrolle der Mäuse mittels ELISA gezeigt worden, dass die Mäuse keine bzw. geringe Immunisierung gegen den Histidin-Schwanz des zur Immunisierung verwendeten Proteins aufwiesen, dennoch wurden ausgewählte Klone hierauf mittels ELISA abermals getestet, um solche Klone von vornherein für die weiteren Testungen ausschließen zu können. Hierfür wurden die Überstände der ausgewählten Klone jeweils auf Bindung gegenüber dem Proteinprodukt von pET28a Δ T7/PKD2C und dem von pGEX-4T-1/PKD2C kodierten GST-Proteinprodukt, das keinen Histidin-Schwanz enthält, getestet. Wären die Antikörper des Klons nur gegen den Histidin-Schwanz gerichtet, sollten bei der Verwendung des Proteinprodukts von pET28a Δ T7/PKD2C hohe Extinktionswerte erhalten werden, während sie bei dem GST-Fusionsprotein denen der Negativ-Kontrolle entsprechen müssten. Es zeigte sich, dass alle getesteten Klone Antikörper gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 und nicht gegen den Histidin-Schwanz produzierten.

12 Klone aus Fusion 1 und 13 Klone aus Fusion 2 wurden zusätzlich mittels Western Blot getestet. Für die Testung mittels Western Blot wurden die Proteinprodukte von pET28a Δ T7/PKD2C, pGEX-4T-1/PKD2C und pET21b/CIP1 (116/493), das einen Histidin-Schwanz enthält, verwendet, um zu prüfen, ob der Antikörper gegen den Histidin-Schwanz gerichtet, wie gewünscht gegen Polycystin-2 gerichtet oder ob er möglicherweise unspezifisch ist. Lediglich bei 7 Klonen (58%) aus der ersten Fusion und bei 5 Klonen (31%) aus der zweiten Fusion konnte die gewünschte Antikörperproduktion nachgewiesen werden. Die übrigen Klone produzierten keine Antikörper gegen den Histidin-Schwanz. Eine unspezifische Antikörperproduktion war bei 3 Klonen (25%) aus der ersten Fusion und 2 Klonen (15%) aus der zweiten Fusion festzustellen, die restlichen Klone zeigten keine Banden im Western Blot.

Dadurch zeigte sich jedoch, dass die mittels ELISA getesteten Klone nicht unbedingt spezifisch waren und es musste der ELISA als Testmethode hinterfragt werden. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass eine Beschichtung der Platten mit 0,5 µg Protein pro Vertiefung sowie eine Verwendung des anti-Maus IgG Antikörpers in einer Verdünnung von 1:10.000 einen geringen Hintergrund lieferte, so dass diese Bedingungen beibehalten wurden. Als mögliche Problemquelle wurde der PBS-Puffer gesehen. In diesem war sowohl das zur Immunisierung verwendete Protein gelöst gewesen als auch das zur Beschichtung der Platten verwendete Protein. Zudem wurde PBS-Puffer in der Blocklösung für den ELISA als auch für die Waschungen verwendet. Um diese potentielle Fehlerquelle auszuschließen, wurde versuchsweise BBS-Puffer in der Blocklösung als auch für die Waschungen verwendet. Dies führte jedoch zu ähnlichen Ergebnissen wie bei Verwendung des PBS-Puffers, so dass dieser für die weiteren Testungen beibehalten wurde. Zum Ausschluss einer Beeinflussung des jeweiligen Zellmediums mit dem zur Beschichtung verwendeten Proteins wurde dieses in der Negativ-Kontrolle als primärer Antikörper verwendet. Dies lieferte Extinktionswerte, die denen unbeschichteter Vertiefungen entsprachen, so dass eine Beeinflussung durch das jeweilige Medium ausgeschlossen werden konnte. In dieser Phase der Antikörpertestung konnte jedoch das Problem mit der ELISA-Testung nicht zufriedenstellend gelöst werden. Zwar lieferte ein negatives Ergebnis im ELISA immer auch ein negatives Ergebnis im Western Blot, bei positiven Ergebnissen im ELISA musste zu diesem Zeitpunkt immer auch ein Western Blot durchgeführt werden. Damit sollte sichergestellt werden, dass das Protein nicht nur in seiner nativen Form im ELISA, sondern auch als denaturiertes Protein im Western Blot erkannt wurde.

Da die von den sieben Klonen aus der ersten Fusion bzw. von den fünf Klonen aus der zweiten Fusion produzierten Antikörper später jedoch nicht nur größere Mengen von aufgereinigtem Protein, sondern auch kleinste Mengen von PC2 erkennen sollten, wurde zudem ein Western Blot mit Zelllysat aus transfizierten COS-7-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich lediglich bei fünf der Klonüberstände eine ausreichende Antikörperproduktion bzw. Sensitivität, woraufhin diese mittels Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation weiter getestet wurden. Es zeigte sich, dass lediglich drei Klone in allen Testungen positive Resultate lieferten.

4.5 Subklonierung

Um die Monoklonalität der Antikörper zu gewährleisten, musste sichergestellt werden, dass jeder Klon aus einer einzigen Zelle hervorging. Aufgrund des ca. 24-stündigen Teilungszyklusses der Hybridomzellen lagen am Folgetag meist bereits zwei Zellen pro Vertiefung vor, wobei nicht unterschieden werden konnte, ob es sich hierbei um zwei identische oder verschiedene Zellen handelte. Somit wurde es notwendig, die verbliebenen Klone (F1-47, F1-17, F1-27, F1-48, F2-9) durch Zellvereinzelung zu subklonieren. Wie bereits von Georges J. F. Köhler und César Milstein beschrieben, erfolgte nach erfolgreicher erster Subklonierung eine weitere Subklonierung, um die statistische Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, einen Klon zu erhalten.

Die erste Subklonierung gestaltete sich jedoch relativ schwierig, da nur Klon F1-47 bei einer Ausplattierung von einer Zelle/Vertiefung in HT-Medium ausreichende Wachstumstendenzen zeigte und dabei auch seine spezifische Antikörperproduktion beibehielt. Die Klone F1-17, F1-48 und F2-9 zeigten unter einer Ausplattierung in einer Konzentration von einer bis zehn Zellen/Vertiefung kaum Wachstumstendenzen, und auch die Variation der Ausgangs-

zelldichte von 100.000 – 500.000 Zellen/ml verbesserte nicht das Wachstum der Klone nach Subklonierung.

Da Klon F1-48 auch ohne Subklonierung in Passage 3 lediglich ein mäßiges Wachstum zeigte und in dem vor der Subklonierung durchgeföhrten Kontroll-ELISA keine Antikörperproduktion mehr aufwies, musste dieser Klon aufgegeben werden. Die Subklone von F1-27 zeigten hingegen eine sehr starke Wachstumstendenz und konnten mittels ELISA positiv getestet werden. Jedoch zeigten sich im zur Bestätigung durchgeföhrten Western Blot wiederholt unspezifische Banden. Vor der Subklonierung war für F1-27 jedoch auch im Western Blot eine spezifische Antikörperproduktion nachgewiesen worden, so dass die Vermutung nahe lag, dass dieser Klon neben den spezifischen antikörperproduzierenden Zellen auch Zellen eines zweiten, nicht spezifische Antikörper produzierenden Klons enthielt. Es wurde angenommen, dass dieser zweite Klon entweder durch die Bedingungen der Subklonierung möglicherweise einen Wachstumsvorteil erlangte oder der gewünschte Klon die Fähigkeit zur Synthese von Antikörpern mit der Zeit verlor.

Da die Klone vereinzelt kaum Wachstum zeigten, während sie in Massenkultur gut passagiert werden konnten, wurde vermutet, dass sich die Hybridomzellen in größerer Kultur möglicherweise gegenseitig durch Botenstoffe zum Wachstum anregten. Deshalb wurde versucht, die Zellen mit diesem „gebrauchten“ Medium aus der Massenkultur zu vereinzelnen. Hierbei zeigte sich jedoch keinerlei Vorteil gegenüber der Verwendung von „frischem“ HT-Medium.

Nachdem diese Subklonierungsversuche keine befriedigenden Ergebnisse liefern konnten, wurde ein Versuch mit Makrophagen unternommen. In zahlreichen Arbeiten, darunter auch McCullough et al. 1983, Butcher et al. 1988 und Fuller et al. 2001, konnte gezeigt werden, dass die unter der Subklonierung vereinzelten Hybridomzellen unter Anwesenheit von Makrophagen wesentlich bessere Wachstumstendenzen zeigten.

Hierfür wurden Peritoneal-Makrophagen gewonnen und ausplattiert. Die Zugabe der Hybridomzellen erfolgte erst nach zwei Tagen, um die Makrophagen an die Zellkultur zu gewöhnen und um eine eventuell Verunreinigung mit Pilzen bereits vor der Subklonierung zu erkennen. Hier zeigte sich bei allen Subklonen der drei Ausgangsklone (F1-17, F1-27, F2-9) ein wesentlich verbessertes Wachstum. Die Subklone von Klon F1-17 wie auch die Subklone von Klon F2-9 zeigten sowohl im ELISA als auch im zur Bestätigung durchgeföhrten Western Blot eine spezifische Antikörperproduktion. Bei dem Subklon von F1-27 hingegen schien auch bei der Methode mit Makrophagen ein Wachstumsvorteil der unspezifischen Zellen zu bestehen, so dass dieser Klon aufgegeben werden musste. Eine mögliche alternative Erklärung mag auch in der „Zellart“ zu finden sein. Bei allen Klonen handelt es sich ja um Hybridomzellklone. Dies bedeutet, dass bei allen Klonen die Zellen aus einer Fusion aus den Chromosomen der ursprünglichen Milzzelle wie auch der ursprünglichen Myelomzelle hervorgehen. Bedenkt man nun, wie viele Zellteilungen zwischen der Fusion bis zum zweiten Subklon liegen mussten, dann erscheint es durchaus denkbar, dass sich die Fusion im Laufe der Zellteilungen als instabil erwies. Somit könnte die Ausgangszelle der jeweiligen zweiten Subklone noch über die Fähigkeit der spezifischen Antikörperproduktion verfügt haben, die im Laufe weiterer Zellteilung verloren ging.

Die zweite Subklonierung wurde für den Subklon von F1-47 in HT-Medium und für die Subklone von F1-27 und F2-9 mit Makrophagen durchgeführt. Hierfür wurden die Subklone mit einer Konzentration von 0,5 Zellen/Vertiefung sowie mit einer Zelle/Vertiefung

ausplattiert. Die vereinzelten Zellen der Subklone bildeten in > 90% Klonformationen. Die Klone mit der stärksten Wachstumstendenz wurden dann mittels Western Blot getestet. Alle Subklone von F1-47 und F2-9 zeigten eine spezifische Antikörperproduktion, so dass vermutet werden kann, dass bereits der erste Subklon der Ausgangsklone monoklonal war.

Bei den zweiten Subklonen von F1-17 hingegen zeigte sich lediglich bei wenigen zweiten Subklonen eine sehr schwache spezifische Antikörperproduktion sowie ein sehr starker Hintergrund im Western Blot. Die Tatsache, dass nicht jeder der zweiten Subklone von F1-17 positiv getestet werden konnte, mag möglicherweise daran liegen, dass nach der ersten Subklonierung dieser Klon noch nicht monoklonal war. Somit würden die nicht den spezifischen Antikörper produzierenden Zellen von einem weiteren Klon abstammen, der sich zusammen mit dem gewünschten Klon F1-17 in Zellkultur befand. Anders als bei dem Klon F1-27 würde bei diesem „zweiten“ Klon jedoch keinen Wachstumsvorteil in der Subklonierung bestehen. Damit ließen sich zwar die negativ getesteten zweiten Subklone erklären, jedoch nicht, warum die positiv getesteten zweiten Subklone nach der Subklonierung wesentlich schwächere Banden im Western Blot lieferten. Als Folge auf die schlechte Antikörperproduktion der Subklone nach der zweiten Subklonierung wurde der Klon F1-17 aufgegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Subklonierung als äußerst schwierig gestaltete und zum Verlust zweier Klone führte.

4.6 Mediumwechsel

In der von Georges J. F. Köhler und César Milstein 1976 im European Journal of Immunology veröffentlichten Arbeit „*Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*“ wurden die Klone 8-14 Tage in HAT-Selektionsmedium und anschließend in HT-Medium kultiviert. Ungefähr vier Wochen nach der Fusion konnte von HT-Medium auf Standardmedium (Dulbecco's modified Eagle's Medium mit 10% hitzeaktiviertem Pferdeserum) umgestellt werden [Köhler 1976].

Auch in dieser Arbeit bestand das Bestreben, die Zellen möglichst frühzeitig aus dem HAT-Selektionsmedium in das Standardmedium (90% RPMI 1640/10% FCS) zu überführen. Dies sollte erfolgen, da es nicht länger notwendig war, einen der beiden Stoffwechselwege der Klonzellen mittels Aminopterin zu unterdrücken. Als Zeitpunkt wurde ähnlich historischen Vorbild der Zeitraum 3-4 Wochen nach Fusion in Abhängigkeit von der Wachstumstendenz des jeweiligen Klons gewählt. Anders als bei Köhler und Milstein wurde versucht, direkt von HAT-Selektionsmedium ohne den Zwischenschritt des HT-Mediums auf das Standardmedium zu wechseln.

Zum Mediumwechsel wurden die Zellen zunächst in 90% RPMI 1640/10% FCS resuspendiert. Hierin zeigte sich jedoch kein Zellwachstum, sondern ein Absterben der Klone nach ca. 4 Tagen.

Da vermutet wurde, dass β-Mercaptoethanol, von dem man weiß, dass es die B-Lymphozyten zum Wachstum anregt [McCullough 1983], möglicherweise auch einen positiven Effekt auf das Wachstum der Hybridomzellen hätte, wurden die Zellen in einem zweiten Versuch in 90% RPMI 1640/10% FCS/0,5% β-Mercaptoethanol resuspendiert. Dies führte jedoch zu

ähnlichen Resultaten wie beim ersten Versuch, ähnlich den weiteren im Ergebnisteil beschriebenen Versuchen des Medienwechsels.

Da jedoch nach erfolgreicher zweiter Subklonierung ein komplikationsloser Mediumwechsel bei den Subklonen F1-47 und F2-9 in 80% RPMI 1640 / 20% FCS und bei Subklon F1-47 anschließend auch in 90% RPMI 1640 / 10% FCS möglich war, muss zusammenfassend geurteilt werden, dass sich im Nachhinein der Versuch des Mediumwechsels vor der Subklonierung als hinderlich erwies. Da die Klone hierzu in Massenkultur gehalten werden mussten, bestand die Gefahr, dass ebenfalls in der ursprünglichen Vertiefung der 96-Lochplatte vorkommende Klone mit unspezifischer Antikörperproduktion in Massenkultur möglicherweise einen Wachstumsvorteil hatten. Zudem mussten die Klone durch mehrmaliges Splitten in das „neue“ Medium passagiert werden, wodurch bereits einige Klone ihre Fähigkeit zur spezifischen Antikörperproduktion verloren und deshalb aufgegeben wurden.

4.7 Endergebnisse

Als Ergebnis dieser Arbeit sind zwei voneinander unabhängige monoklonale Antikörper entstanden, die gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 gerichtet sind.

Der monoklonale Antikörper des Klons F1-47 S1-3.2 (bzw. des identischen Klons F1-47 S1-3.3) wurde im ELISA, in der Immunpräzipitation, in der Immunfluoreszenz und im Western Blot erfolgreich getestet. Die Lagerung des Antikörpers kann bei -20°C erfolgen.

Der monoklonale Antikörper des Klons F2-9 S1-5.2 (bzw. des identischen Klons F2-9 S1-5.4) wurde ebenfalls mittels ELISA, in der Immunpräzipitation, in der Immunfluoreszenz und im Western Blot erfolgreich getestet. Da eine Lagerung bei -20°C zum Funktionsverlust des Antikörpers führte, muss die Lagerung bei +4°C erfolgen.

Somit liegen fast 10 Jahre nach Herstellung des ersten polyklonalen Antikörpers gegen Polycystin-2 erstmalig auch monoklonale Antikörper gegen das C-terminale Ende von Polycystin-2 vor, deren Testung mittels Immunhistochemie allerdings noch aussteht. Auch erfolgte im Rahmen dieser Arbeit noch keine Isotypisierung.

Mit den hergestellten monoklonalen Antikörpern sollten sich neue Erkenntnisse und Aufschlüsse über die Funktion und Interaktion des C-terminalen Endes des menschlichen Polycystin-2 Proteins erhalten lassen.

5 Zusammenfassung

Seit im Juni 1999 von den unabhängigen Forschergruppen um Stefan Somlo sowie Albert C. M. Ong zeitgleich die polyklonalen Kaninchen-Antikörper YCC2, YCB9 sowie p30 gegen Polycystin-2 veröffentlicht wurden, sind bis zum heutigen Tag eine Vielzahl von gegen Polycystin-2 gerichtete polyklonale Antikörper entwickelt worden (Cai 1999, Ong 1999). Jedoch war bis dato noch kein Antikörper in einer anderen Spezies als Kaninchen bzw. noch kein monoklonaler Antikörper hergestellt worden.

Ziel dieser Arbeit war es monoklonale Maus-Antikörper gegen die C-terminale Domäne von Polycystin-2 herzustellen mit einer großen Anwendungsbreite in verschiedenen Versuchsmethoden. Hierfür wurde zunächst das C-terminale Ende des menschlichen Polycystin-2 Proteins in den Expressionsvektor pET28a kloniert. Aufgrund des Histidin-Schwanzes konnte das Fusionsprotein mittels Ni²⁺-Säule aufgereinigt werden. Mit diesem aufgereinigten Protein erfolgte die Immunisierung von 6 Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen, aus deren Milzen die Antikörper produzierenden B-Lymphozyten gewonnen werden konnten. Diese wurden in zwei Zellfusionen mit Myelomzellen der Zelllinie X63Ag8.6.5.3 fusioniert. Die Überstände der daraus entstehenden Klone wurden mittels ELISA, Western Blot, Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation auf ihre Spezifität überprüft und anschließend die Klone zweimalig subkloniert, um die Monoklonalität der Antikörper zu gewährleisten.

Hierbei konnten insgesamt zwei monoklonale Mausantikörper gewonnen werden: Erstens der monoklonale Antikörper des Klons F1-47 S1-3.2 (bzw. des identischen Klons F1-47 S1-3.3) sowie zweitens der monoklonale Antikörper des Klons F2-9 S1-5.2 (bzw. des identischen Klons F2-9 S1-5.4).

Der monoklonale Antikörper des Klons F1-47 S1-3.2 (bzw. des identischen Klons F1-47 S1-3.3) kann bei -20°C gelagert und im ELISA, in der Immunpräzipitation, in der Immunfluoreszenz (bis zu einer Verdünnung von 1:300) und im Western Blot (bis zu einer Verdünnung von 1:300) verlässlich eingesetzt werden.

Der monoklonale Antikörper des Klons F2-9 S1-5.2 (bzw. des identischen Klons F2-9 S1-5.4) musste bei +4°C gelagert werden, da eine Lagerung bei -20°C zum Funktionsverlust führte. Der monoklonale Antikörper konnte ebenfalls erfolgreich im ELISA, in der Immunpräzipitation, in der Immunfluoreszenz (bis zu einer Verdünnung von 1:300) sowie im Western Blot (bis zu einer Verdünnung von 1:1.000) verlässlich eingesetzt werden.

6 Literaturverzeichnis

Adeva M., El-Youssef M., Rossetti S., Kamath P.S., Kubly V., Consugar M.B., Milliner D.M., King B.F., Torres V.E., Harris P.C. (2006). Clinical and molecular characterization defines a broadened spectrum of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Medicine* 85: 1-21

Aguiari G., Banzi M., Gessi S., Cai Y., Zeggio E., Manzati E., Piva R., Lambertini E., Ferrari L., Peters D.J., Lanza F., Harris P.C., Borea P.A., Somlo S., del Senno L. (2004). Deficiency of polycystin-2 reduces Ca^{2+} channel activity and cell proliferation in ADPKD lymphoblastoid cells. *FASEB J* 18: 884-6

Bergmann C., Senderek J., Küpper F., Schneider F., Dornia C., Windelen E., Eggermann T., Rudnik-Schöneborn S., Kirlfel J., Furu L., Onuchic L.F., Rossetti S., Harris P.C., Somio S., Guay-Woodford L., Germino G.G., Moser M., Büttner R., Zerres K. (2004). PKHD1 mutations in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Mutat* 23: 453-63

Bergmann C., Küpper F., Dornia C., Schneider F., Senderek J., Zerres K. (2005). Algorithm for efficient PKHD1 mutation screening in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Mutat* 25: 225-231

Burn T.C., Connors T.D., Dackowski W.R., Petry L.R., Van Raay T.J., Millholland J.M., Venet M., Miller G., Hakim R.M., Landes G.M. (1995). Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (*PKD1*) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. The American PKD1 Consortium (APKD1 Consortium). *Hum Mol Genet* 4: 575-582

Butcher R.N., Kenneth C., McCullough, Jarry C., Bryant J. (1988). Mitomycin C-treated 3T3/B (3T3/A31) cell feeder layers in hybridoma technology. *J Immunol Methods* 107: 245-251

Cai Y., Maeda Y., Cedzich A., Torres V.E., Wu G., Hayashi T., Mochizuki T., Park J.H., Witzgall R., Somlo S. (1999). Identification and characterization of polycystin-2, the *PKD2* gene product. *J Biol Chem.* 274: 28557-28565

Chapmann A.B., Johnson A., Gabow P.A., Schrier R.W. (1990). The renin-angiotensin-aldosteron-system and autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 323: 1091-1096

Chauvet V., Tian X., Husson H., Grimm D.H., Wang T., Hiesberger T., Igarashi P., Bennett A.M., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Somlo S., Caplan M.J. (2004). Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest* 114: 1433-1443

Connor A., Lunt P.W., Dolling C., Patel Y., Meredith A.L., Gardner A., Hamilton N.K., Dudley C.R. (2008). Mosaicism in autosomal dominant polycystic kidney disease revealed by genetic testing to enable living related renal transplantation. *Am J Transplant.* 8: 232-237

Consugar M.B., Wong W.C., Lundquist P.A., Rossetti S., Kubly V.J., Walker D.L., Rangel L.J., Aspinwall R., Niaudet W.P., Ozen S., David A., Velinov M., Bergstrahl E.J., Bae K.T., Chapman A.B., Guay-Woodford L.M., Grantham J.J., Torres V.E., Sampson J.R., Dawson B.D., Harris P.C.; CRISP Consortium (2008). Characterization of large rearrangements in autosomal dominant polycystic kidney disease and the *PKD1/TSC2* contiguous gene syndrome. *Kidney Int* 74: 1468-1479

Dalgaard O.Z. (1957). Bilateral polycystic disease of the kidneys: A follow-up of two hundred and eighty-four patients and their families. *Acta Med Scand Suppl.* 328: 1-255

Davies F., Coles G.A., Harper P.S., Williams A.J., Evans C., Cochlin D. (1991). Polycystic kidney disease re-evaluated: A population-based study. *Q J Me.* 79: 477-485

Demetriou K., Tziakouri C., Anninou K., Eleftheriou A., Koptides M., Nicolaou A., Deltas C.C., Pierides A. (2000). Autosomal dominant polycystic kidney disease – type 2. Ultrasound, genetic and clinical correlations. *Nephrol Dial Transplant* 15: 205-211

Desmet V.J. (1992). Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme “ductal plate malformation”. *Hepatology* 16: 1069-1083

De StGroth S.F., Scheidegger D. (1980). Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods* 35: 1-21

Foggensteiner L., Bevan A.P., Thomas R., Coleman N., Boulter C., Bradley J., Ibraghimov-Beskrovnaia O., Klinger K., Sandford R. (2000). Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the *PKD2* gene. *J Am Soc Nephrol* 11: 814-827

Fuller S.A., Takahashi M., Hurrell J.G. (2001). Preparation of mouse feeder cells for fusion and cloning. *Curr Protoc Mol Bio, Wiley-Interscience, United States, F.M. Ausubel:* Chapter 11: Unit 11.6

Gabow P.A., Johnson A.M., Kaehny W.D., Manco-Johnson M.L., Duley I.T., Everson G.T. (1990). Risk factors of the development of hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hepatology* 11: 1033-1037

Gabow P.A., Johnson A.M., Kaehny W.D., Kimberling W.J., Lezotte D.C., Duley I.T., Jones R.H. (1992). Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 41: 1311-1319

Gabow P.A. (1993). Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 329: 332-342

Gabow P.A., Kimberling W.J., Strain J.D., Manco-Johnson M.L., Johnson A.M. (1997). Utility of ultrasonography in the diagnosis of autosomal polycystic kidney disease in children. *J Am Soc Nephrol* 8: 105-110

Gagnadoux M.F., Broyer M. (1998). Polycystic kidney disease in children. *Oxford Textbook of Nephrology, Oxford University Press, New York, Oxford University Press Inc* 2385-2393

González-Perrett S., Kim K., Ibarra C., Damiano A.E., Zotta E., Batelli M., Harris P.C., Reisin I.L., Arnaout M.A., Cantiello H.F. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1182-1187

González-Perrett S., Batelli M., Kim K., Essafi M., Timpanaro G., Moltabetti N., Reisin I.L., Arnaout M.A., Cantiello H.F. (2002). Voltage dependence and pH regulation of human polycystin-2-mediated cation channel activity. *J Biol Chem* 277: 24959-24966

Grantham J.J., Ye M. (1993). The secretion of fluid by renal cysts from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 329: 310-313

Grantham J.J. (2003). Understanding polycystic kidney disease: a systems biology approach. *Kidney Int* 64: 1157-1162

Grantham J.J., Chapman A.B., Torres V.E. (2006). Volume progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: the major factor determining clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 148-157

Grantham J.J. (2008). Clinical practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 359: 1477-1485

Grunfeld J., Albouz G., Jungers P. (1985). Liver changes and complications in adult polycystic kidney disease. *Adv Nephrol Necker Hosp* 14: 1-20

Guay-Woodford L.M., Desmond R.A. (2003). Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. *Pediatrics* 111: 1072-80

Hackmann K., Markoff A., Quian F., Bogdanova N., Germino G.G., Pennekamp P., Dworniczak B., Horst J., Gerke V. (2005). A splice form of polycystin-2, lacking exon 7, does not interact with polycystin-1. *Hum Mol Genet* 21: 3249-3262

Hanaoka K., Quian F., Boletta A., Bhunia A.K., Piontek K., Tsiokas L., Sukhatme V.P., Guggino W.B., Germino G.G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -1 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408: 990-994

Harris H., Watkins J.F. (1965). Hybride cells derived from mouse and man: artifical heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature* 205: 640-646

Harris P.C., Bae K., Rossetti S., Torres V.E., Grantham J.J., Chapman A.B., Guay-Woodford L.M., King B.F., Wetzel L.H., Baumgarten D.A., Kenney P.J., Consugar M., Klahr S., Bennett W.M., Meyers C.M., Zhang Q.J., Thompson P.A., Zhu F., Miller J.P. (2006). Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the muted gene in ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 17: 3013-3019

Harris P.C., Torres V.E. (2009). Polycystic kidney disease. *Annu. Rev. Med.* 60 27.1-27.17

Harrap S.B., Davies D.L., Macnicol A.M., Dominiczak A.F., Fraser R., Wright A.F., Watson M.L., Briggs J.D. (1991). Renal, cardiovascular and hormonal characteristics of young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 40: 501-508

Hateboer N., van Dijk M.A., Bogdanova N., Coto E., Saggar-Malik A.K., San Millan J.L., Torra R., Breuning M., Ravine D. (1999). Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* 353: 103-107

Hughes J., Ward C.J., Peral B., Aspinwall R., Clark K., San Millán J.L., Gamble V., Harris P.C. (1995). The polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat. Genet.* 10: 151-160

Ibraghimov-Beskrovnyaya O., Dackowski W.R., Foggensteiner L., Coleman N., Thiru S., Petry L.R., Burn T.C., Connors T.D., Van Raay T., Bradley J., Qian F., Onuchic L.F., Watnick T.J., Piontek K., Hakim R.M., Landes G.M., Germino G.G., Sandford R., Klinger K.W. (1997). Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6397-6402

Ibraghimov-Beskrovnyaya O. (2007). Targeting dysregulated cell cycle and apoptosis for polycystic kidney disease therapy. *Cell Cycle* 6: 776-779

International Polycystic Kidney Disease Consortium (1995). Polycystic kidney disease: the complete structure of the *PKD1* gene and its protein. *Cell* 81: 289-298

Kim I., Fu Y., Hui K., Moeckel G., Mai W., Li C., Liang D., Zhao P., Ma J., Chen X.Z., George A.L.Jr., Coffey R.J., Feng Z.P., Wu G. (2008). Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function. *J Am Soc Nephrol* 19: 455-468

Klingel R., Dippold W., Storkel S., Meyer, Zum Buschenfelde K.H., Köhler H. (1992). Expression of differentiation antigens and growth-related genes in normal kidney, autosomal dominant polycystic kidney disease and renal cell carcinoma. *Am J Kidney Dis* 19: 22-30

Köhler G.J.F., Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497

Köhler G.J.F., Milstein C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunology* 6: 511-519

Köhler G.J.F. (1984). Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Nobel lecture, Basel*

Köttgen M., Benzing T., Simmen T., Trauber R., Buchholz B., Feliciangeli S., Huber T.B., Schermer B., Kramer-Zucker A., Hopker K., Simmen K.C., Tschucke C.C., Sandford R., Kim E., Thomas G., Walz G. (2005). Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J* 24: 705-716

Koulen P., Cai Y., Geng L., Maeda Y., Nishimura S., Witzgall R., Ehrlich B.E., Somlo S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol* 4: 191-197

Kupin W., Norris C., Levin N.W., Johnson C., Joseph C. (1987). Incidence of diverticular disease in patients with polycystic kidney disease (PCKD) (abstract). *Proc 10th Int Cong Nephrol London* 1987: p43

Lakkis M., Zhou J. (2003). Molecular complexes formed with the polycystins. *Nephron Exp Nephrol* 93: e3-e8

Lantinga-van Leeuwen I.S., Dauwerse J.G., Baelde H.J., Leonhard W.N., van de Wal A., Ward C.J., Verbeek S., Deruiter M.C., Breunung M.H., de Heer E., Peters D.J. (2004). Lowering of *Pkd1* expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 13: 3069-3077

Lantinga-van Leeuwen I.S., Leonhard W.N., van der Wal A., Breunung M.H., de Heer E., Peters D.J. (2007). Kidney-specific inactivation of the *Pkd1* gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice. *Hum Mol Genet* 16: 3188-3196

Leuenroth S.J., Okuhara D., Shotwell J.D., Markowitz G.S., Yu Z., Somlo S., Crews C.M. (2007). Triptolide is a traditional Chinese medicine-derived inhibitor of polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4389-4394

Li Q., Dai Y., Guo L., Liu Y., Hao C., Wu G., Basona N., Michalak M., Chen X. (2003). Polycystin-2 associates with Tropomyosin-1, an Actin Microfilament Component. *J Mol Biol* 325: 949-962

Low S.H., Vasanth S., Larson C.H., Mukherjee S., Sharma N., Kinter M.T., Kane M. E., Obara T., Weimbs T. (2006). Polycystin-1, STAT6 and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev Cell* 10: 57-69

Lu W., Peissel B., Babakhanlou H., Pavlova A., Geng L., Fan X., Larson C., Brent G., Zhou J. (1997). Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted *Pkd1* mutation. *Nat Genet* 17: 179-181

Lu W., Fan X., Basora N., Babakhanlou H., Law T., Rifai N., Harris P.C., Perez-Atayde A.R., Rennke H.G., Zhou J. (1999). Late onset of renal and hepatic cysts in *Pkd1*-targeted heterozygotes. *Nat Genet* 21: 160-161

Luo Y., Vassilev P.M., Li X., Kawanabe Y., Zhou J. (2003). Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca²⁺ -permeable cation channel in renal epithelia. *Mol Cell Biol* 23: 2600-2607

McCullough K.C., Butcher R.N., Parkinson D. (1983). Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against foot-and-mouse disease virus (FMDV): II. Cloning conditions. *J Biol Stand* 11: 183-194

McCullough K.C., Butcher R.N., Parkinson D. (1983). Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus 1. Cell culturing requirements. *J Biol Stand* 11: 171-181

McCUTCHAN J.H., PAGANO J. S. (1968). Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *J Natl Cancer Inst* 41: 351-7

MENEZES L.F., ONUCHIC L.F. (2006). Molecular and cellular pathogenesis of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Braz J Med Biol Res* 39: 1537-1548

MOCHIZUKI T., WU G., HAYASHI T., XENOPHONTOS S.L., VELDHUISEN B., SARIS J.J., REYNOLDS D.M., CAI Y., GABOW P.A., PIERIDES A., KIMBERLING W.J., BREUNING M.H., DELTAS C.C., PETERS D.J., SOMLO S. (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272: 1339-1342

MONTELL C. (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 90: RE1

MOY G.W., MENDOZA L.M., SCHULZ J.R., SWANSON W.J., GLABE C.G., VACQUIER V.D. (1996). The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J Cell Biol* 133: 809-817

NASH D.A.JR. (1997). Hypertension in polycystic kidney disease without renal failure. *Arch Intern Med* 137: 1571-1575

NAULI S.M., ALENGHAT F.J., LUO Y., WILLIAMS E., VASSILEV P., LI X., ELIA A.E., LU W., BROWN E.M., QUINN S.J., INGBER D.E., ZHOU J. (2003). Polycystin 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33: 129-137

NIV Y., TURANI C., KAHLAN E., FRASER G.M. (1997). Association between pancreatic cystadenocarcinoma, malignant liver cysts, and polycystic disease of the kidney. *Gastroenterology* 112: 2104-2107

OBARA T., MANGOS S., LIU Y., ZHAO J., WIESSNER S., KRAMER-ZUCKER A.G., OLALE F., SCHIER A.F., DRUMMOND I.A. (2006). Polycystin-2 immunolocalization and function in Zebrafish. *J Am Soc Nephrol* 17: 2706-2718

OSATHANONDH V., POTTER E.L. (1964). Pathogenesis of polycystic kidneys. Type 1 due to hyperplasia of interstitial portions of collecting tubules. *Arch Pathol* 77: 466-473

ONG A.C.M., HARRIS P.C. (1997). Molecular basis of renal cyst formation – one hit or two? *Lancet* 349: 1039-1040

ONG A.C.M., WARD C.W., BUTLER R.J., BIDDOLPH S., BOWKER C., TORRA R., PEI Y., HARRIS P.C. (1999). Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am Pathol* 154: 1721-1729

ONG A.C.M., HARRIS P.C. (2005). Molecular pathogenesis of ADPKD: the polycystin complex gets complex. *Kidney Int* 67: 1234-1247

ONUCHIC L.F., FURU L., NAGASAWA Y., HOU X., EGGERMANN T., REN Z., BERGMANN C., SENDEREK J., ESQUIVEL E., ZELTNER R., RUDNIK-SCHÖNEBORN S., MRUG M., SWEENEY W., AVNER E.D., ZERRES K., GUAY-WOODFORD L.M., SOMLO S., GERMINO G.G. (2002). PKHD1,

the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet* 70: 1305-1317

Pecucchi B., Aguiari G., Pignatelli A., Manzati E., Witzgall R., del Senno L., Belluzzi O. (2006). Nonspecific cation current associated with native Polycystin-2 in HEK-293 cells. *J Am Soc Nephrol* 17: 388-397

Pei Y., Watnick T., He N., Wang K., Liang Y., Parfrey P., Germino G., St George-Hyslop P. (1999). Somatic *PKD2* mutations in individual kidney and liver cysts support a “two-hit” model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 10: 1524-1529

Perrone R.D. (1997). Extrarenal manifestations of ADPKD. *Kidney Int* 51: 2022-2036

Piontek K., Menezes L.F., Garcia-Gonzales M.A., Huso D.L., Germino G.G. (2007). A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of *Pkd1*. *Nat Med* 13: 1490-1495

Ponting C.P., Hofmann K., Bork P. (1999). A latrophilin/CL-1-like GPS domain in polycystin-1. *Curr Biol* 9: 585-588

Praetorius H.A., Spring K.R. (2005). A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol* 67, 515-529

Qian F., Germino F.J., Cai Y., Zhang X., Somlo S., Germino G.G. (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 16: 179-183

Qian F., Boletta A., Bhunia A.K., Xu H., Liu L., Ahrabi A.K., Watnick T.J., Zhou F., Germino G.G. (2002). Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16981-16986

Qian Q., Du H., King B.F., Kumar S., Dean P.G., Cosio F.G., Torres V.E. (2008). Sirolimus reduces polycystic liver volume in ADPKD patients. *J Am Soc Nephrol* 19: 631-638

Ravine D., Gibson R.N., Walker R.G., Sheffield L.J., Kincaid-Smith P., Danks D.M. (1994). Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. *Lancet* 343: 824-827

Reeders S.T., Breuning M.H., Davies K.E., Nicholls R.D., Jarman A.P., Higgs D.R., Pearson P.L., Weatherall D.J. (1985). A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317: 542-544

Rinkel G.J., Djibuti M., Algra A., van Gijn J. (1998). Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systemic review. *Stroke* 29: 251-256

Rizk D., Chapman A. (2008). Treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): the new horizon for children with ADPKD. *Pediatr Nephrol* 23: 1029-1036

Rossetti S., Consugar M.B., Chapman A.B., Torres V.E., Guay-Woodford L.M., Grantham J.J., Bennett W.M., Meyers C.M., Walker D.L., Bae K., Zhang Q.J., Thompson P.A., Miller J.P., Harris P.C.; CRISP Consortium (2007). Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18: 2143-2160

Roy S., Dillon M.J., Trompeter R.S., Barratt T.M. (1997). Autosomal recessive polycystic kidney disease: long-term outcome of neonatal survivors. *Pediatr Nephrol* 11: 302-306

Ruggenenti P., Remuzzi A., Ondei P., Fasolini G., Antiga L., Ene-Iordache B., Remuzzi F., Epstein F.H. (2005). Safety and efficacy of long-acting somatostatin treatment in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 68: 206-216

Russo R.J., Husson H., Joly D., Bukanov N.O., Patey N., Knebelmann B., Ibraghimov-Beskrovnaia O. (2005). Impaired formation of desmosomal junctions in ADPKD epithelia. *Histochem Cell Biol* 124: 487-497

Sampson J.R., Maheshwar M.M., Aspinwall R., Thompson P., Cheadle J.P., Ravine D., Roy S., Haan E., Bernstein J., Harris P.C. (1997). Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet* 61: 843-851

Sandford R., Sgotto B., Aparacio S., Brenner S., Vaudin M., Wilson R.K., Chissoe S., Pepin K., Bateman A., Chothia C., Hughes J., Harris P. (1997). Comparative analysis of the polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene reveals an integral membrane glycoprotein with multiple evolutionary conserved domains. *Hum Mol Genet* 6: 1483-1489

Scheff R.T., Zuckerman G., Marter H., Delmez J., Koehler R. (1980). Diverticular disease in patients with chronic renal failure due to polycystic kidney disease. *Ann Intern Med* 92: 202-204

Schmid M., Mann J.F., Stein G., Herter M., Nussberger J., Klingbeil A., Ritz E. (1990). Natriuresis-pressure relationship in polycystic kidney disease. *J Hypertens* 8: 277-283

Schwenger V., Zeier M. (1999). Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 10: 7-20

Schievink W.I., Torres V.E., Piepras D.G., Wiebers D.O. (1992). Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 3: 88-95

Shillingford J.M., Murcia N.S., Larson C.H., Low S.H., Hedgepeth R., Brown N., Flask C.A., Novick A.C., Goldfarb D.A., Kramer-Zucker A., Walz G., Piontek K.B., Germino G.G., Weimbs T. (2006). The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5466-5471

Sklar A.H., Caruana R.J., Lammers J.E., Strauser G.D. (1987). Renal infections in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 10: 81-88

Sutters M., Germino G.G. (2003). Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular genetics and pathophysiology. *J Lab Clin Med* 141: 91-101

Tao Y., Kim J., Schrier R.W., Edelstein C.L. (2005). Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16: 46-51

Tao Y., Kim J., Yin Y., Zafar I., Falk S., He Z., Faubel S., Schrier R.W., Edelstein C.L. (2007). VEGF receptor inhibition slows the progression of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 72: 1358-1366

Taylor M., Johnson A.M., Tison M., Fain P., Schrier R.W. (2005). Earlier diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease: importance of family history and implications for cardiovascular and renal complications. *Am J Kidney Dis* 46: 415-423

The European Polycystic Kidney Disease Consortium (1994). The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77: 881-894

Thomsen H., Thaysen J.H. (1998). Frequency of hepatic cysts in adult polycystic kidney disease. *Acta Med Scand* 224: 381-384

Torra R. (2008). New therapeutic prospects in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nefrologia* 28: 257-262

Torres V.E., Wilson D.M., Hattery R.R., Segura J.W. (1993). Renal stone disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 22: 513-519

Torres V.E., Sweeney W.E., Wang X., Oian O., Harris P.C., Frost P., Avner E.D. (2003). EGF receptor tyrosin kinase inhibition attenuates the development of PKD in Han:SPRD rats. *Kidney Int* 64: 1573-1579

Torres V.E., Harris P.C. (2006). Mechanisms of Disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases. *Nat Clin Pract Nephrol* 2: 40-55

Tsiokas L., Kim E., Amould T., Sukhatme V.P., Walsz G. (1997). Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of *PKD1* and *PKD2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6965-6970

Van Adelsberg J., Chamberlain S., D'Agati V. (1997). Polycystin expression is temporally and spatially regulated during renal development. *Am J Physiol* 272: 602-609

Vassilev P.M., Guo L., Chen X.Z., Segal Y., Peng J.B., Basora N., Babakhanlou H., Cruger G., Kanazirska M., Ye C., Brown E.M., Hediger M.A., Zhou J. (2001). Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca(2+) homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 341-350

Wahl P.R., Serra A.L., Le H.M., Molle K.D., Hall M.N., Wüthrich R.P. (2006). Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol Dial Transplant* 21: 598-604

Wan L., Molloy S.S., Thomas L., Liu G., Xiang Y., Rybak S.L., Thomas G. (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* 94: 205-216

Wang S., Luo Y., Wilson P.D., Witmann G.B., Zhou J. (2004). The autosomal recessive polycystic kidney disease protein is localized to primary cilia, with concentration in the basal body area. *J Am Soc Nephrol* 15: 592-602

Wang S., Zhang J., Nauli S.M., Li X., Starremans P.G., Luo Y., Roberts K.A., Zhou J. (2007). Fibrocystin/Polyductin, Found in the same protein complex with Polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia. *Molec Cell Biol* 27: 3241-3252

Ward C., Hogan M.C., Rossetti S., Walker D., Sneddon T., Wang X., Kubly V., Cunningham J.M., Bacallao R., Ishibashi M., Milliner D.S., Torres V.E., Harris P.C. (2002). The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large receptor-like protein. *Nat Genet* 30: 259-269

Ward C.J., Yuan D., Masyuk T.V., Wang X., Punyashthiti R., Whelan S., Bacallao R., Torra R., LaRusso N.F., Torres V.E., Harris P.C. (2003). Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* 12: 2703-2710

Wilson P.D. (2004). Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 350: 151-164

Wu G. (2001). Current advances in molecular genetics of polycystic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 23-31

Yamaguchi T., Pelling J.C., Ramaswamy N.T., Eppler J.W., Wallace D.P., Nagao S., Rome L.A., Sullivan L.P., Grantham J.J. (2000). cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int* 57: 1460-1471

Yamaguchi T., Nagao S., Wallace D.P., Belibi F.A., Cowley B.D., Pelling J.C., Grantham J.J. (2003). Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 63: 1983-1994

Yamaguchi T., Wallace D.P., Magenheimer B.S., Hempson S.J., Grantham J.J., Calvet J.P. (2004). Calcium restriction allows cAMP activation of B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *J Biol Chem* 279: 40419-40430

Yamaguchi T., Hempson S.J., Reif G.A., Hedge A.M., Wallace D.P. (2006). Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 17: 178-187

Yoder B.K., Hou X., Guay-Woodford L.M. (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13: 2508-2516

Zhang M.Z., Mai W., Li C., Cho S.Y., Hao C., Moeckel G., Zhao R., Kim I., Wang J., Xiong H., Wang H., Sato Y., Wu Y., Nakanuma Y., Lilova M., Pei Y., Harris R.C., Li S.,

Coffey R.J., Sun L., Wu D., Chen X.Z., Breyer M.D., Zhao Z.J., McKenna J.A., Wu G. (2004). PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2311-2316

Zeier M, Jones R., Ritz E. (1996). Autosomal dominant polycystic kidney disease – the patient on renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* 11: 18-20

Zerres K., Mucher G., Bachner L., Deschennes G., Eggermann T., Kaariainen H., Knapp M., Lennert T., Misselwitz J., von Muhlendahl K.E. (1994). Mapping the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nat Genet* 7: 429-432

Zerres K., Rudnik-Schöneborn S., Deget F., Holtkamp U., Brodehl J., Geisert J., Schärer K. (1996). Autosomal recessive polycystic kidney disease in 115 children: clinical presentation, course and influence of gender. *Acta Paediatrica* 85: 437-445

Zerres K., Rudnik-Schöneborn S., Steinkamm C., Becker J., Mucher G. (1998). Autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Mol Med* 76: 303-309

7 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1** Schematische Darstellung von Polyductin (in Anlehnung an Harris 2008).
- Abb. 1.2** Schematische Darstellung von Polycystin-1 (in Anlehnung an Harris 2008).
- Abb. 1.3** Schematische Darstellung von Polycystin-2 (in Anlehnung an Harris 2008).
- Abb. 1.4** Angenommene zelluläre Veränderungen in polyzystischen Nierenzellen (modifiziert nach Harris 2009 und Torra 2008).
- Abb. 1.5** Angenommene zelluläre Veränderungen in polyzystischen Nierenzellen und potentielle Therapieansätze (modifiziert nach Harris 2009 und Torra 2008).
- Abb. 1.6** Schematische Darstellung der Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridom-Technik von Georges J. F. Köhler und César Milstein (modifiziert nach Köhler 1984: *Derivation and diversification of monoclonal antibodies*, Nobel lecture).
- Abb. 1.7** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das menschliche Polycystin-2 Protein.
- Abb. 3.1** Darstellung des aufgereinigten Proteins.
- Abb. 3.2** Darstellung des aufgereinigten Proteins.
- Abb. 3.3** Darstellung des aufgereinigten Proteins.
- Abb. 3.4** Darstellung der DNA nach Testverdau.
- Abb. 3.5** Schematische Darstellung des Immunisierungsablaufes.
- Abb. 3.6a-f** Erfolgskontrolle der Mäuseimmunisierung mittels ELISA.
- Abb. 3.7** Western Blot zur Bestätigung der ELISA – Beispiele.
- Abb. 3.8** Testung der Klone mittels Western Blots (mit Protein aus Zelllysat).
- Abb. 3.9** Testung der Klone mittels Immunpräzipitation.
- Abb. 3.10** Testung der Klone mittels Immunfluoreszenz.
- Abb. 3.11** Testung der Subklone von F1-47 mittels Western Blot.
- Abb. 3.12** Testung der Subklone von F1-17, F1-27 und F2-9 mittels Western Blot.
- Abb. 3.13** Testung der Subklone von F1-47 S1-3 mittels Western Blot.
- Abb. 3.14** Verdünnungsreihe des Subklons F1-47 S1-3.2 in der Immunfluoreszenz.

- Abb. 3.15** Testung der Subklone F1-47 S1-3.2 und F1-47 S1-3.3 mittels Immunpräzipitation.
- Abb. 3.16** Verdünnungsreihe des Subklons F1-47 S1-3.2 im Western Blot.
- Abb. 3.17** Verdünnungsreihe des Subklons F2-9 S1-5.4 in der Immunfluoreszenz.
- Abb. 3.18** Testung der Subklone F2-9 S1-5.2 und F2-9 S1-5.4 mittels Immunpräzipitation.
- Abb. 3.19** Verdünnungsreihe des Subklons F2-9 S1-5.4 im Western Blot.

8 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.1** Die gebräuchlichsten Antikörper gegen Polycystin-2.
- Tab. 2.1** Übersicht der verwendeten Chemikalien, Medien und Reagenzien.
- Tab. 2.2** Verwendete Kits.
- Tab. 2.3** Zusammenstellung der Verbrauchsmaterialien.
- Tab. 2.4** Übersicht der benutzten Geräte und Instrumente.
- Tab. 2.5** Übersicht der benutzten Software.
- Tab. 2.6** Übersicht der verwendeten Enzyme.
- Tab. 2.7** Übersicht der verwendeten Plasmide.
- Tab. 2.8** Übersicht der verwendeten Primärantikörper.
- Tab. 2.9** Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.
- Tab. 2.10** Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.
- Tab. 2.11** Übersicht der verwendeten Säugerzelllinien.
- Tab. 2.12** Übersicht der verwendeten Materialien zur DNA-Klonierung.
- Tab. 2.13** Übersicht der verwendeten Materialien in der Zellkultur.
- Tab. 2.14** Übersicht der verwendeten Materialien für die Immunfluoreszenz.
- Tab. 2.15** Übersicht der verwendeten Materialien für Proteingel und Western Blot.
- Tab. 2.16** Übersicht der verwendeten Puffer zur Proteinaufreinigung mittels Ni²⁺-Säule.
- Tab. 2.17** Übersicht der verwendeten Puffer zur Proteinaufreinigung mittels Glutathion-Säule.
- Tab. 2.18** Übersicht der verwendeten Materialien für die Immunpräzipitation.
- Tab. 2.19** Übersicht der verwendeten Materialien für ELISA.
- Tab. 2.20** Übersicht der verwendeten Materialien zur Transfektion von COS-7-Zellen.
- Tab. 2.21** Übersicht der verwendeten Zelllinien und des jeweiligen Kulturmedium.
- Tab. 3.1** Screening auf positive Klone mittels ELISA.

- Tab. 3.2** Test auf positive Klone mittels ELISA.
- Tab. 3.3** Darstellung der Auswertung des Tests auf positive Klone mittels ELISA.
- Tab. 3.4** Übersicht über die im Western Blot verwendeten Proteine.
- Tab. 3.5** Schema der möglichen Anzahl der Banden und Lage im Western Blot je nach Spezifität der Klone.
- Tab. 3.6** Ergebnisdarstellung der Versuche des Mediumwechsels.
- Tab. 3.7** Testung von F1-47 mittels ELISA auf positive Subklone.
- Tab. 3.8** Ergebnisdarstellung von Versuch 1 von F1-47.
- Tab. 3.9** Ergebnisübersicht von Versuch 1 von F1-17, F1-27, F1-48 und F2-9.
- Tab. 3.10** Ergebnisübersicht von Versuch 3.
- Tab. 3.11** Screening auf positive Subklone mittels ELISA.
- Tab. 3.12** Ergebnisübersicht der Subklone.
- Tab. 3.13** Testung der monoklonalen Antikörper der Subklone von F1-47 mittels ELISA.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kerstin Nicole Nadine Renner, geb. Vogt
Geburtsdatum	09.07.1982
Geburtsort	Regensburg
Familienstand	verheiratet

Schulausbildung

1989 - 1993	Grundschule Tegernheim
1993 - 2002	Werner-von-Siemens-Gymnasium in Regensburg, Abschluss: Abitur, Note 1,5

Hochschulausbildung

2002 - 2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
08.09.2004	Physikum, Gesamtnote „gut“
02.12.2008	Staatsexamen Humanmedizin, Gesamtnote „gut“

Promotion

Beginn 2005	„Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das menschliche Polycystin-2 Protein“, Betreuer Prof. Dr. med. Ralph Witzgall Universität Regensburg (Vorklinik: Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie)
-------------	--

Famulaturen

14.02.05 - 06.03.05	Prof. Dr. med. Wieland, Abteilung für Urologie, Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg
17.02.06 - 19.03.06	Prof. Dr. med. Loew, Abteilung für Psychosomatik, Klinik Donaustauf
26.08.06 - 26.09.06	Dr. med. Ehlert, Hautarzt - Allergologie, Regensburg
28.09.06 - 15.10.06	Prof. Dr. med. Loew, Abteilung für Psychosomatik, Klinik Donaustauf
17.02.06 - 19.03.06	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Landthaler, Abteilung für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Regensburg

Praktisches Jahr

27.08.07 - 14.10.07	Prof. Dr. med. Salzberger, Abteilung Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg
15.12.07 - 16.12.07	Prof. Dr. med. Pfeifer, Abteilung Innere Medizin, Klinik Donaustauf

17.12.07 - 06.04.08	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Landthaler, Abteilung für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Regensburg
07.04.08 - 04.05.08	Dr. Peter Gray, Orthopaedic Surgery Department, Ryde Hospital, Sydney, Australia
05.05.08 - 01.06.08	Dr. John Kippen, Plastics and Facio-maxillary Surgery Department, Royal North Shore Hospital, Sydney, Australia
02.06.08 - 27.07.08	Prof. Dr. med. Schlitt, Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg

Besondere Kenntnisse

Sprachen EDV

Englisch in Wort und Schrift Microsoft Office Programme, SAP

Soziales Engagement

2000 - 2002

Kinder- und Jugendbetreuerin im Sportverein FC Tegernheim

2000 - 2002

ehrenamtliche Tatigkeit fur Samhathi-Hilfe fur Indien e.V., Organisation von Benifizballen 2001 und 2002 in Regensburg

Seit 1994

ehrenamtliche Mitarbeit in der Gemeindebücherei
Tegernheim

Hobbies und Interessen

Lesen, Joggen, Radfahren

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Kerstin Nicole Nadine Renner, geb. Vogt,
geboren am 09.07.1982 in Regensburg,

an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das menschliche Polycystin-2 Protein“

von mir selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen
verwendet wurden.

Diese Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form bei keiner anderen
Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Tegernheim, den 09.08.2010

(Kerstin Renner)

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Ralph Witzgall bedanken, der mich überaus freundlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mich während der Durchführung dieser Arbeit mit Rat aber auch mit Tat unterstützte.

Weiterhin möchte ich mich bei Anne Rascle und Helen Hoffmeister sowie allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre aufmunternde Unterstützung bedanken, wenn die Versuche mal nicht ganz so verliefen wie sie sollten.